

---

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ

PAR M. LE PROFESSEUR SAWTCHENKO (DE KASAN).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur.)

---

### I

#### ROLE DES SUBSTANCES BACTÉRICIDES ET DES CELLULES VIVANTES DANS L'IMMUNITÉ CONTRE LE CHARBON

Les recherches, publiées par *Pfeiffer* sur le rôle des substances bactéricides chez les animaux ayant une immunité active ou passive contre le vibron cholérique, ont paru d'abord confirmer les notions déjà acquises sur les substances bactéricides et leur rôle dans l'immunité.

*Gruber* et *Durham* rapprochèrent ensuite le pouvoir agglutinant du sérum préventif du pouvoir bactéricide des humeurs des animaux immunisés. D'après eux, le sérum préventif doit cette propriété à une substance (agglutinine) agissant directement sur les membranes microbiennes. Les microbes ainsi modifiés deviennent accessibles à l'influence des phagocytes et des humeurs bactéricides.

L'importance des faits énoncés par *Pfeiffer*, *Gruber* et *Durham*, et surtout les conclusions qu'on en a tiré à l'appui des diverses théories de l'immunité, conduisent à se poser la question suivante : Observe-t-on chez tous les animaux immunisés, et contre tous les microbes, les phénomènes indiqués par ces savants, ou bien n'y a-t-il qu'une coexistence fortuite entre l'immunité artificielle et les pouvoirs bactéricide et agglutinant ?

Pour étudier cette question, nous avons choisi un microbe bien connu : la bactériémie charbonneuse.

Pour élucider le rôle des substances bactéricides dans l'immunité, nous nous sommes servi, comme animal d'expérience, du rat, dont le sérum, comme l'a démontré Behring, possède un grand pouvoir bactéricide par rapport à la bactériémie.

Pour étudier les propriétés agglutinatives du sérum sur la bactériémie, nous avons employé le sérum du cheval et du chien, immunisés contre le charbon.

## II

SUBSTANCE BACTÉRICIDE ; SON ACTION SUR LES MICROBES IN VITRO ;

ADAPTATION DES MICROBES A CETTE SUBSTANCE

La communication de Behring sur le pouvoir bactéricide du sérum du rat, pouvoir qui, d'après ce savant, serait la cause de l'immunité du rat contre le charbon, fut suivie de toute une série de travaux qui ont prouvé que les rats sont loin d'être tous réfractaires au charbon, et que les rats dont le sérum est bactéricide périssent eux-mêmes très facilement du charbon.

Les rats dont nous nous sommes servis dans nos expériences succombaient non seulement au charbon virulent, mais même au 2<sup>e</sup> et au 1<sup>er</sup> vaccin, si on inoculait les bactériémies sous la peau. Ces mêmes animaux nous fournirent un sérum extrêmement bactéricide *in vitro*.

Cela provoque naturellement un doute sur l'existence d'un pouvoir bactéricide dans l'organisme.

Avant de rechercher les substances bactéricides dans l'organisme même, et d'expliquer le désaccord apparent entre la sensibilité du rat pour le charbon et le pouvoir bactéricide évident de son sérum, nous avons étudié les propriétés bactéricides de ce dernier *in vitro*.

Les expériences avec le sérum en dehors de l'organisme furent faites dans des tubes à essai à la température de 37°, et aussi à la température de la chambre (15-20°). Comme comparaison, on employait du sérum de cobayes, qui, d'après des expé-



riences préalables, n'avait aucun pouvoir bactéricide, même pour le 1<sup>er</sup> vaccin.

Si on ajoute à une petite quantité de sérum (4 c. c.) de rat normal une quantité égale d'émulsion d'une culture charbonneuse (âgée de 20 heures) sur gélose, on peut observer, déjà après 10-15 minutes, à la température de 37°, une modification des bactériidies : on voit au microscope qu'elles sont devenues granuleuses, un peu gonflées, tandis que les bactériidies, mélangées dans les mêmes conditions au sérum du cobaye, sont restées aussi homogènes que dans la culture.

Après une heure, l'action du sérum du rat est déjà si intense, que, sur les préparations traitées par le bleu de méthylène, on ne retrouve plus de filaments, mais seulement des granules colorés. Ceux-ci sont parfois disposés en chaînettes, trace d'anciens filaments, mais les granules sont complètement isolés les uns des autres.

Après 24 heures, le mélange, qui était trouble au début de l'expérience, devient tout à fait transparent. Ce n'est que rarement qu'on rencontre, à cette époque, des granulations gonflées : *les filaments de la bactériidie sont non seulement tués, mais aussi dissous par le sérum.*

Ainsi se manifeste, au point de vue morphologique, l'effet bactéricide du sérum, quand nous opérons sur une culture virulente de bactériidies en filaments ou bien sur une culture asporogène à filaments. Les faits sont quelque peu différents quand nous opérons sur des cultures des 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> vaccin, cultures dont nous nous sommes surtout servi pour l'étude des propriétés bactéricides du sérum.

C'est pour deux raisons que nous les avons préférées au virus : 1° elles se développent sur gélose en forme de bâtonnets, ce qui permet d'obtenir facilement une émulsion homogène et de les reprendre au point d'inoculation ; 2° la constance de leur virulence permet une comparaison quantitative des agents qui agissent sur elles.

Dans nos expériences, nous avons toujours employé des cultures sur gélose âgées de 16 heures, et en émulsion dans une solution de NaCl à 5 0/00.

La quantité de culture employée pour l'expérience peut être dosée avec une assez grande précision si on emploie des tubes à

essai de même dimension, dans lesquels on dilue le produit du raclage de surfaces égales de cultures sur gélose dans des quantités égales de NaCl — 2 c. c.

Les modifications morphologiques des bâtonnets des vaccins charbonneux sous l'influence du sérum bactéricide sont si caractéristiques, qu'elles permettent de juger du pouvoir bactéricide à l'examen microscopique simple d'une préparation. Si on colore sur lamelle par du bleu de méthylène phéniqué les bâtonnets des vaccins charbonneux en émulsion dans une solution de NaCl à 5 0/00, on les voit homogènes, bien colorés, sans aucune trace de membrane colorée. L'aspect est le même chez les bactéridies, mélangées avec le sérum de cobaye.

Les préparations faites avec un mélange des bactéridies et du sérum du rat présentent déjà, après 15 à 20 minutes (à l'étuve), une différence prononcée avec les préparations de contrôle.

Une grande quantité des bâtonnets ne se colore pas du tout en bleu par le bleu de méthylène : ils sont gonflés, arrondis et colorés en rose-violet. D'autres ont la partie centrale bien colorée par le bleu, mais on voit sur la périphérie une membrane gonflée et colorée en violet. Après 2-3 heures, la majorité des bactéridies ne contient plus du tout de substance centrale colorée en bleu, mais prennent une coloration homogène en rose-violet; quelques-unes sont désagrégées en granules violets. D'autres ont leurs membranes fortement gonflées et la substance colorée en bleu presque complètement disparue. On trouve encore de courts bâtonnets avec des restes de substance colorée en bleu, mais avec une membrane violette tellement gonflée, qu'ils ont l'aspect, non plus de bâtonnets, mais de corps ovales ou sphériques.

Sous l'influence ultérieure du sérum, après 24 heures, le mélange, de trouble qu'il était, devient transparent, et nous ne trouvons au microscope que de rares granules gonflés et colorés en violet.

La mort de la bactéridie débute par le gonflement de sa membrane; ensuite c'est la substance chromatique qui se dissout, et enfin la membrane elle-même disparaît.

On obtient par ensemencement des colonies de moins en moins nombreuses à mesure que ces phénomènes se déroulent. Après 24 heures, quelquefois déjà après 7-10 heures, les ense-



mencements restent stériles, et alors on voit au microscope que les bâtonnets ne se colorent plus en bleu.

Cette description démontre que le processus de la mort des bactériidies introduites dans du sérum de rat, se rapproche beaucoup au point de vue morphologique des modifications décrites par Pfeiffer pour le vibron cholérique introduit dans le péritoine des cobayes réfractaires au choléra.

Afin de définir le degré de puissance bactéricide du sérum, nous avons fait des mélanges d'une émulsion du premier vaccin avec diverses doses de sérum.

Nous avons employé dans nos expériences des mélanges préparés avec 2 gouttes d'émulsion de culture (on délayait le contenu d'une culture sur gélose dans 2 c. c. de solution de NaCl), ce qui correspond à  $1/20$  de la culture, et diverses quantités de sérum bactéricide.

En dosant le sérum bactéricide, nous y ajoutons du sérum de cobaye, non bactéricide, afin d'avoir toujours une quantité égale de liquide dans nos tubes à essai.

En ensemençant simultanément une série de sérums bactéricides dilués en proportions diverses, on peut définir la quantité minimale du sérum bactéricide nécessaire pour tuer en 24 heures la majorité des bactériidies et pour empêcher la végétation de celles non tuées. Voici une des expériences :

QUANTITÉ DE LA CULTURE DU 1 <sup>er</sup> VACCIN.	Quantité du sérum du cobaye.	Quantité du sérum du rat.	Examen au microscope après 24 heures.	RÉSULTAT de l'ensemencement sur gélose de 2 gouttes de liquide.
1/20 dans 2 gouttes d'émulsion, avec solu- tion de NaCl.	15 gouttes.	5 gouttes.	Pas de microbes vivants.	3 colonies.
	17 gouttes.	3 gouttes.	Pas de microbes vivants.	7 colonies.
	19 gouttes.	1 goutte.	Peu de bactéridies vivantes.	20 colonies.
	20 gouttes.	1/2 goutte.	La plupart des bactéridies vivantes.	Culture épaisse.
	10 gouttes.	10 gouttes.	Pas de bactéridies vivantes. Liquide transparent.	Ensemencement stérile.

Cette expérience démontre que le sérum du rat employé tue déjà les bactéridies à la dose de 1 : 20.

Dans la majorité des dix expériences faites par nous et analogues à celle qui vient d'être citée, le sérum du rat était bactéricide à peu près à 1 : 20. Le sérum le moins bactéricide, à 2 : 20, nous fut fourni par un jeune rat (20 grammes).

La comparaison de l'influence bactéricide du sérum sur le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>e</sup> vaccin démontre que le 2<sup>e</sup> vaccin est moins sensible. Ainsi : tandis que pour tuer 1/20 de culture du 1<sup>er</sup> vaccin, il suffisait d'un c. c. du mélange à 1 : 20 (une goutte de sérum de rat + 20 gouttes de sérum de cobaye), pour tuer 1/20 de culture du 2<sup>e</sup> vaccin, il fallait 1 c. c. du mélange à 8 : 20 (8 parties du sérum de rat sur 20 parties du sérum de cobaye).

C'est surtout dans les expériences avec le sérum chauffé que se manifeste la différence de sensibilité des vaccins à l'influence des propriétés bactéricides. Chauffé pendant une 1/2 heure à 61°, le sérum de rat manifeste encore une influence visiblement



bactéricide sur le 1<sup>er</sup> vaccin, mais ne tue pas du tout les bactériidies du 2<sup>e</sup> vaccin.

Les exemples cités prouvent déjà que *les substances bactéricides agissent chimiquement sur les corps des microbes. De même que les diastases, elles les dissolvent et sont elles-mêmes détruites par les températures élevées.*

On voit aussi qu'il doit exister une certaine corrélation entre la quantité des microbes et celle des substances bactéricides nécessaires pour les tuer.

Si l'on ajoute peu de substance bactéricide à une quantité donnée de microbes, ils ne seront détruits qu'en partie, les substances bactéricides étant pour ainsi dire fixées par les corps des bactéries tuées, ce qui permet la végétation des autres. En d'autres termes, la substance bactéricide est usée, elle est neutralisée par les corps des microbes.

Les expériences ont pleinement confirmé cette hypothèse.

Voici un exemple :

On mélange 3 c. c. de sérum de rat avec 1/2 c. c. d'une émulsion épaisse de virus charbonneux cultivé sur gélose pendant 24 heures. Après 12 heures, tous les filaments sont tués et désagregés en granulations. On ajoute dans le même tube à essai 1 c. c. d'émulsion d'une culture de 18 heures. Après 40 heures d'exposition à l'étuve, la majorité des bactériidies est tuée, mais il y a encore des filaments bien conservés.

On soumet le mélange à l'action de l'appareil centrifuge et l'on décante le liquide transparent.

On ajoute à 1 c. c. du liquide 3 gouttes d'émulsion fraîche de la culture du virus sur gélose et, à une autre portion, 3 gouttes d'émulsion du 2<sup>e</sup> vaccin.

Après 7 heures d'exposition à l'étuve, on ne constate aucune action bactéricide.

Dans notre expérience, le sérum de rat était un peu dilué par les additions successives de l'émulsion (3 : 1,5). Mais cette dilution n'avait eu aucune influence, car, dans l'expérience de contrôle, où la dilution était la même, le liquide avait conservé tout son pouvoir bactéricide.

Nous avons répété ces expériences plusieurs fois, toujours avec le même résultat. *La substance bactéricide est consommée en détruisant les microbes, et il existe toujours un certain maximum de*

*microbes qui peut être tué par une quantité donnée de sérum.*

Toutes les expériences citées furent faites avec des cultures sur gélose et *in vitro*.

Mais en supposant (et cette supposition se trouve confirmée par les expériences exposées dans le 3<sup>e</sup> chapitre) que les substances bactéricides existent dans l'organisme vivant, et en constatant que, malgré cela, les rats succombent au charbon et contiennent des bactériidies dans leur sang, il faut admettre que les bactériidies s'adaptent facilement aux substances bactéricides. Cela est facile à démontrer.

Nous avons vu que le 2<sup>e</sup> vaccin et même le virus sont facilement et complètement détruits par le sérum non dilué. Mais si l'on ajoute au sérum de rat une portion double de sérum de cobaye, et si l'on ajoute à ce mélange une quantité suffisante de culture du 2<sup>e</sup> vaccin sur gélose (1/10 de culture), on constate, après 24 heures, que la majorité des microbes n'est pas tuée et qu'ils commencent à se développer en nouveaux filaments. Si l'on ajoute alors une quantité égale de sérum de rat, la culture continue à se développer, quoique lentement.

Si ensuite nous ensemençons cette culture dans du sérum de rat, non mélangé, non seulement nous n'observons plus d'action bactéricide, mais nous obtenons une culture charbonneuse dans le sérum de rat. Ainsi les microbes s'adaptent facilement aux substances bactéricides.

Parallèlement aux expériences avec le sérum de rat, nous en fîmes avec celui du cheval, du pigeon et du chien. Ces deux derniers animaux sont, comme on sait, peu sensibles au charbon.

Par contre, le cheval est très sensible à cette maladie.

Le sérum de pigeon se montre peu bactéricide, et cela encore à 40-42°. Le sérum de chien n'est pas du tout bactéricide, même pour le premier vaccin, et la bactériidie charbonneuse s'y développe comme dans le sérum de cobaye. Par contre, le sérum de cheval s'est montré très bactéricide pour les vaccins et pour le virus. Les substances bactéricides de ce sérum agissent sur les bactériidies de même que le sérum de rat. Chauffé à 61-62°, le sérum de cheval perd aussi son pouvoir bactéricide. La substance bactéricide de ce sérum se consomme aussi, se neutralise par l'addition d'un excès de microbes et les microbes s'adaptent



aussi facilement à ces substances bactéricides qu'à celles du sérum de rat.

### III

SUBSTANCES BACTÉRICIDES DANS L'ORGANISME VIVANT. — LYMPHE SOUS-CUTANÉE. — PLASMA SANGUIN. — PLASMA PÉRITONÉAL

Nous avons dit, au début de cet article, que les rats dont nous nous sommes servis, et qui nous fournissaient un sérum très bactéricide, étaient eux-mêmes tellement sensibles au charbon, qu'ils succombaient même au premier vaccin, injecté sous la peau. La mort survenait entre 3-10 jours. L'inoculation provoquait toujours un œdème très fort du tissu cellulaire, s'étendant depuis le point d'inoculation à la patte jusqu'au dos et jusqu'au ventre. Le deuxième vaccin les tuait encore plus vite, en 2-4 jours, en provoquant les mêmes symptômes.

Le virus tuait les rats en 36-48 heures.

Il a été démontré par toute une série d'observations que le sang des rats morts du charbon contient très peu de microbes comparativement à celui des autres animaux (cobaye, lapin); chez les rats, les bactériidies sont localisées, surtout au point d'inoculation et dans la rate. Les leucocytes sont presque complètement absents dans les œdèmes pendant la vie du rat. Les bactériidies y sont enveloppées de membranes distinctes (coloration de Kühne) qui se colorent en rose violet.

Après l'inoculation du premier vaccin, on trouve parfois des bactériidies qui se comportent comme dans le sérum *in vitro*, mais la majorité en est normale et présente les membranes décrites.

Un tel état des microbes sous la peau peut dépendre, ou bien de leur adaptation rapide aux substances bactéricides, ou bien de l'absence de celles-ci dans la lymphe sous-cutanée. Pour résoudre cette question, nous avons étudié le liquide d'un œdème provoqué par l'arrêt de la circulation.

Nous avons pu conclure de cette étude que la lymphe n'est pas bactéricide si elle ne contient point de globules sanguins<sup>1</sup>.

1. Pour obtenir le liquide œdémateux, nous faisons une ligature sur les jambes de derrière du rat, aussi haut que possible. Après quelques heures, quand l'œdème devenait apparent (après 7-8 h.), on ponctionnait le rat, en ayant soin

Les bactériidies, même du premier vaccin, mélangées avec une telle lymphé et exposées à l'étuve, continuent à se développer tout aussi bien que dans le sérum de cobaye.

Mais si l'on mélange 10-15 gouttes de cette lymphé avec une goutte de sang du même rat, et si l'on étudie l'action bactéricide, après que la coagulation s'est faite, on voit que les bactériidies du premier vaccin périssent tout aussi bien que dans le sérum de cobaye, additionné d'une même quantité de sérum de rat. Si l'on exprime avec la lymphé de l'œdème un peu de sang, on obtient aussi un liquide bactéricide.

Dans les expériences faites sur les animaux, c'est-à-dire en introduisant sous la peau une émulsion de premier vaccin dans le tissu œdémateux, on observe de même des membranes enveloppant des bactériidies, l'absence d'action bactéricide visible, et une généralisation de l'infection.

L'œdème passif diffère évidemment de l'œdème actif, et une transfusion de substances bactéricides est possible dans ce dernier cas.

Pour trancher cette question, nous avons provoqué un œdème actif par l'inoculation d'une émulsion de culture virulente. Déjà après 10-12 heures, il se produit un fort œdème, s'étendant sur le dos et l'abdomen. En prenant une goutte de lymphé d'un endroit de l'œdème, éloigné du point d'inoculation, on ne trouve que les bactériidies isolées ou point du tout. C'est dans ces régions de l'œdème actif que nous injectons une émulsion de bactériidies du 1<sup>er</sup> vaccin, comme étant très sensibles aux substances bactéricides. En étudiant de temps en temps les bactériidies injectées, on voit qu'elles ne périssent pas, mais continuent à se développer de même que dans l'œdème passif.

En prenant plusieurs échantillons au même endroit, nous pouvons trouver des bactériidies tuées sur nos préparations. Cela est dû évidemment à la lésion des vaisseaux sanguins produite par l'introduction du tube effilé sous la peau, ce qui permet aux substances bactéricides du sang d'agir sur les microbes. On peut toujours obtenir artificiellement des phénomènes bactéricides partiels en injectant un peu de sang ou de sérum de rats

d'enlever d'abord les ligatures et autant que possible de chasser le sang des pattes par un léger massage. Cette précaution est indispensable, car autrement, en exprimant le liquide œdémateux, nous obtenons aussi du sang.



après avoir inoculé sous la peau des bactériidies. Dans ce cas l'infection se développe quand même et le rat succombe. Les expériences de Roux et Metchnikoff ont démontré que les bactériidies mélangées antérieurement avec du sérum de rat, et ensuite injectées sous la peau, ne produisent pas d'infection.

Nous pouvons conclure de toutes les expériences citées que *les substances bactéricides ne transfusent pas à travers les parois vasculaires dans le liquide adélateux, du moins pas en quantité assez grande pour produire une action bactéricide appréciable*<sup>1</sup>.

A la suite de ces expériences, la question se pose de savoir si le plasma sanguin de l'organisme contient la substance bactéricide, ou bien s'il n'y en a dans le sérum qu'après la coagulation du sang? On sait qu'il est très facile d'éviter la coagulation du sang en y ajoutant un extrait de têtes de sangsues.

Ayant pris le sang de deux ou trois rats (leur sang étant dilué à moitié par une solution de Na Cl à 5 0/00 dans laquelle on avait dissous l'extrait de sangsues) nous le soumettions à l'action de l'appareil centrifuge pendant 2-3 heures.

Après cette opération, non seulement les globules rouges, mais aussi les globules blancs sont précipités; les plaques sanguines seules restent en suspension dans la portion supérieure du liquide<sup>2</sup>.

Nous divisons le liquide en deux portions, en décantant la partie supérieure, qui ne contenait que peu ou point de leucocytes, dans un récipient séparé de celui qui contenait le reste du plasma avec la couche supérieure des globules rouges (couche très riche en leucocytes).

Après avoir gardé le plasma pendant un ou deux jours au froid pour donner à la majorité des leucocytes le temps de se détruire et de rendre leurs substances bactéricides au plasma (s'il y a de ces substances dans les leucocytes), nous étudîâmes comparativement l'action bactéricide des deux portions du plasma.

1. A ce qu'il paraît, l'absence des substances bactéricides dans la lymphe n'est pas un fait exceptionnel. Ainsi Metchnikoff et Mesnil ont démontré que le phénomène de Pfeiffer ne se produisait pas dans le tissu sous-cutané chez les cobayes immunisés contre les vibrions. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1896.)

2. Nous devons indiquer ici la grande différence dans la quantité des plaques sanguines contenues d'une part, dans le plasma du rat, et, d'autre part, dans celui des cobayes et des chiens. Pendant que le plasma de ces derniers est transparent, celui des rats est opaque par suite de la grande quantité de plaques contenues en suspension et qui, à ce qu'on constate au microscope, ne sont nullement modifiées.

Si l'on ajoute à ce plasma, qui, par lui-même, ne se coagule pas pendant quelques jours, une émulsion de bactériidies, on observe déjà après 2-3 minutes un phénomène à peu près analogue à l'agglutination.

Après 20-30 minutes, le plasma commence à se coaguler autour de la masse des microbes agglutinés. Après 2-3 heures d'exposition à l'étuve, on trouve un coagulum compact et séparé du sérum liquide et transparent. Une préparation étalée sur lamelle démontre que les bactériidies du coagulum sont tuées. Dans le liquide plasmique, on trouve par contre, à côté des bactériidies tuées, d'autres vivantes.

Pour comparer les propriétés bactéricides du plasma contenant des leucocytes avec celles du plasma qui n'en contient pas, il fallait évidemment éliminer la coagulation produite sous l'influence des microbes.

On peut empêcher la coagulation du plasma en le chauffant à 55°.

Ayant préparé le plasma par le procédé décrit, et l'ayant chauffé à 55°, nous étudiâmes ses propriétés bactéricides en employant les méthodes décrites dans le chapitre précédent.

*Il fut constaté que le plasma ainsi préparé est aussi bactéricide que le sérum. De plus, les résultats sont les mêmes, qu'il contienne ou non des leucocytes.*

On peut tout aussi bien démontrer les propriétés bactéricides extracellulaires dans l'organisme vivant, chez le rat, en introduisant les microbes dans la cavité péritonéale.

On introduit dans la cavité péritonéale du rat une émulsion de culture sur gélose de la bactériidie charbonneuse virulente. En examinant de temps en temps l'exsudat péritonéal, on remarque qu'après 1 ou 2 heures (selon la quantité de culture introduite) les filaments des bactériidies ont perdu, en grande majorité, la propriété de se colorer par le bleu de méthylène. Ils sont faiblement colorés et granuleux; on voit dans quelques-uns des granulations isolées et colorées en bleu; ces changements sont analogues à ceux que nous avons observés dans le sérum *in vitro*.

Les filaments sont souvent en pelotes et intimement mélangés aux leucocytes de la cavité péritonéale. Les leucocytes contiennent des bâtonnets charbonneux bien colorés. Quelque-



fois les leucocytes sont enfilés par deux ou trois et plus sur des filaments bactériens. On aurait pu admettre la destruction extracellulaire des bactéries, vu la faible quantité des leucocytes par rapport à celle des bactéries introduites dans l'organisme, et vu l'analogie des phénomènes morphologiques de la dégénérescence des bactéries avec les phénomènes observés *in vitro*. Mais cependant on ne pouvait complètement réfuter l'objection que les bactéries, regardées comme mortes, avaient été antérieurement détruites par les leucocytes. Et cela d'autant plus qu'après 6 ou 7 heures on trouvait dans la cavité péritonéale du rat une nouvelle génération de bâtonnets et de filaments avec des capsules bien nettes, le corps du microbe se colorant facilement, et que, dans cette période, on n'observait que rarement de la phagocytose, si bien que le rat finissait par succomber.

Pour résoudre cette question, nous nous sommes de nouveau adressé aux vaccins. Ceux-ci se cultivent en forme de bâtonnets sur la gélose; les cultures sont homogènes en émulsion et s'étendent uniformément dans la cavité péritonéale sans s'agglutiner en masses mélangées aux leucocytes.

Si l'on introduit dans la cavité péritonéale du rat un quart de culture du 1<sup>er</sup> vaccin sur gélose, culture âgée de 24 heures et en forme d'émulsion, on trouve déjà après une demi-heure une quantité de bactéries mortes dans l'exsudat péritonéal. Ces bâtonnets présentent une analogie complète avec ceux en voie de destruction *in vitro*. A côté de bactéries complètement tuées, on trouve des bâtonnets à membrane fortement gonflée, mais avec un reste de substance prenant la coloration, et des bactéries qui ont résisté à l'action bactéricide de l'exsudat, ce qu'on rencontre aussi au début de l'action du sérum *in vitro*.

On peut voir à côté des leucocytes littéralement bourrés de bactéries. Mais, à cette époque, celles-ci ne présentent aucune modification visible dans l'intérieur du leucocyte; elles se colorent bien en bleu, et sont si entassées qu'il ne peut être question du gonflement de leur membrane, comme nous l'avions vu en dehors des cellules. On pourrait plutôt supposer que, grâce à l'entassement, leur destruction dans les leucocytes commencerait par la membrane.

Dans cette période nous n'avons jamais trouvé ni dans les cellules polynucléaires, ni dans les macrophages, des bactéries

gonflées et colorées en rose violet. En examinant ce même exsudat 4-5 heures après le début de l'expérience, nous avons souvent trouvé, hors des cellules, des bactériidies vivantes se colorant en bleu. Elles avaient toutes subi les modifications décrites plus haut. On trouve dans les leucocytes des bactériidies non encore détruites, dont on peut obtenir des cultures sur gélose en faisant des ensemencements suffisants, tandis qu'on ne trouve plus de bactériidies non modifiées hors des cellules.

Cette expérience souvent répétée et aboutissant toujours au même résultat nous permet de conclure *que dans la cavité péritonéale du rat, les bactériidies sont détruites hors des cellules, sous l'influence bactéricide de l'exsudat, d'une façon tout à fait analogue à celle du sérum in vitro.*

En suivant d'heure en heure les phénomènes qui se passent dans la cavité péritonéale, on observe que 4-5 heures, quelquefois plus, après le début de l'expérience, il s'accumule une quantité de nouveaux leucocytes dans la cavité péritonéale, où ils étaient absents au début.

Mais ces phagocytes, qui englobent les microbes avec tant d'avidité, si on injecte une nouvelle portion d'émulsion du vaccin, — sont par contre tout à fait indifférents aux bactériidies détruites en dehors des cellules. Il est très rare de trouver dans des macrophages des bactériidies colorées en violet; pour la plupart, celles-ci se désagrègent en granules et se dissolvent comme *in vitro*.

Après l'introduction de grandes quantités de cultures du 2<sup>e</sup> vaccin dans le péritoine, les rats succombent à une infection généralisée. Mais alors, dans les premières heures de l'expérience, on trouve toujours une quantité de bactériidies détruites hors des cellules.

On en trouve aussi beaucoup dans les leucocytes; mais il y a toujours des bactériidies libres, bien conservées et encapsulées. Après 5-6 heures, au lieu d'une destruction complète hors des cellules, nous trouvons une augmentation de la quantité des bactériidies et un développement en filaments. Ici aussi on observe une affluence des phagocytes polynucléaires dans la cavité péritonéale, mais une absence de phagocytose de leur part comme dans l'infection par une culture virulente.

Évidemment *les phagocytes des animaux non réfractaires ne peu-*



vent englober les microbes du moment que ceux-ci ont acquis une capsule ; il faut donc regarder le développement de la capsule comme une adaptation défensive des microbes <sup>1</sup>.

## IV

## RAPPORT DES SUBSTANCES BACTÉRICIDES AVEC LES LEUCOCYTES ET LES CELLULES ENDOTHÉLIALES.

Il a été indiqué plus haut que l'injection d'une émulsion de microbes dans le péritoine provoquait toujours une destruction des leucocytes qui s'y trouvaient.

Bordet<sup>2</sup> démontra que la substance bactéricide contre les vibrions cholériques dépend de la quantité des leucocytes, soit dans le péritoine des cobayes, soit dans le sérum.

Antérieurement Metchnikoff<sup>3</sup> avait démontré que la substance bactéricide était contenue dans le protoplasma des cellules polynucléaires. Ainsi la transformation des vibrions en granules se produit dans les leucocytes des cobayes, même non immunisés, si l'on provoque d'abord une leucocytose dans le péritoine, en y injectant du bouillon.

Il était donc naturel de supposer *a priori* que chez le rat, la substance bactéricide était aussi éliminée dans la cavité péritonéale par les leucocytes qui y avaient été détruits.

Les expériences suivantes furent faites pour résoudre cette question.

Nous provoquons une leucocytose dans la cavité péritonéale du rat en y injectant 2 ou 3 c. c. de bouillon, 24 heures avant l'expérience. Nous comparons la quantité des leucocytes du sang avec celle de l'exsudat péritonéal en même quantité.

Nous ajoutons d'une part du sang au sérum de cobaye, milieu indifférent pour le 1<sup>er</sup> vaccin ; nous ajoutons d'autre part de l'exsudat péritonéal à la même quantité de sérum de cobaye. Après avoir gardé au froid ces liquides pendant trois jours, temps nécessaire à la destruction des leucocytes du sang et de l'exsudat, nous comparâmes les propriétés bactéricides des deux

1. C'est Metchnikoff qui a le premier énoncé ce point de vue sur la capsule de la bactériodie. *Virchow's Arch.* 1884.

2. *Ann. de l'Institut Pasteur.* 1897.

3. *Ann. de l'Institut Pasteur.* 1896.

mélanges pour le 1<sup>er</sup> vaccin, d'après la méthode exposée dans le 2<sup>e</sup> chapitre.

Nous pouvions nous attendre à trouver des propriétés bactéricides égales seulement dans le cas où le sang et l'exsudat auraient contenu la même quantité de leucocytes. Mais nous avons toujours constaté une quantité de leucocytes de 7 à 12 fois plus grande dans l'exsudat (5 expériences). Malgré cela, la quantité de substance bactéricide fut trouvée la même pour des volumes égaux, ou bien elle était plus grande pour le sang que pour l'exsudat.

Le résultat de cette expérience coïncide complètement avec les expériences exposées plus haut sur les propriétés bactéricides du plasma avec une quantité différente de leucocytes.

Il s'ensuit que *les leucocytes attirés dans la cavité péritonéale, ne donnent pas les substances bactéricides que nous y trouvons.*

Si, d'un autre côté, nous examinons la qualité de la leucocytose provoquée par l'injection du bouillon, nous constatons facilement que ce sont des cellules polynucléaires que nous avons attirées. On peut donc conclure *que les cellules polynucléaires, en se détruisant, ne donnent pas les substances bactéricides qu'on trouve dans la cavité péritonéale.*

En étudiant d'autre part le contenu de la cavité péritonéale avant l'injection du bouillon ou de la culture charbonneuse, nous ne trouvons qu'une quantité insignifiante de cellules polynucléaires. Ce sont les grandes cellules mononucléaires qui y prédominent. On trouve rarement encore des cellules d'Ehrlich. Les cellules mononucléaires subissent évidemment une phagolyse naturelle, car on en trouve fréquemment avec le protoplasma en voie de destruction ou même des noyaux presque privés de protoplasma.

*Ainsi, si nous regardons les substances bactéricides de la cavité péritonéale comme dérivant des cellules contenues dans cette cavité, c'est aux cellules mononucléaires que nous devons les attribuer.*



## V

LES SUBSTANCES BACTÉRICIDES S'ACCUMULENT-ELLES DANS L'IMMUNISATION ARTIFICIELLE? — IMMUNISATION DES RATS. — PROCÉDÉ DE DÉFENSE DES ANIMAUX IMMUNISÉS CONTRE LE CHARBON. — SENSIBILITÉ DES LEUCOCYTES.

Les expériences exposées dans les chapitres précédents démontrent avec évidence que l'organisme des animaux possédant naturellement les substances bactéricides n'est pas apte à s'en servir comme moyen de défense contre l'infection.

Les substances bactéricides ne deviennent efficaces pour la défense de l'organisme que quand nous créons artificiellement des conditions favorables à l'action directe de ces substances sur les microbes. Telles sont, d'une part, les expériences de Metchnikoff et Roux sur l'inoculation sous-cutanée des rats avec du sérum et des bactériidies, et, d'autre part, les miennes sur l'inoculation péritonéale de ces animaux.

Les expériences de Pfeiffer avec le vibron cholérique permettent de supposer, *a priori*, que les propriétés bactéricides du sérum des rats immunisés artificiellement contre le charbon devraient s'accroître et que, par suite, elles seraient actives contre l'infection sous-cutanée de l'animal.

D'un autre côté, nos expériences ont démontré que le sérum du chien, animal très peu sensible au charbon, ne possède aucun pouvoir bactéricide. Il faudra donc s'attendre, en se plaçant au point de vue de la théorie humorale de l'immunité, à trouver au sérum du chien immunisé artificiellement une action directe sur les microbes.

Nous avons fait des expériences à ce sujet dans les deux directions suivantes :

1<sup>o</sup> Immunisation du rat contre le charbon et étude de l'infection des rats immunisés ;

2<sup>o</sup> Immunisation du chien afin d'obtenir un sérum préventif et étude des propriétés de ce sérum.

Personne n'avait réussi jusqu'ici à immuniser les rats contre le charbon, et ils finissaient toujours par mourir de l'infection devenue chronique.

M. K. Müller n'a réussi à conserver que 6 rats, sur 221 qui

furent inoculés 6 fois préventivement ! De plus, dans ce nombre, il y avait 34 rats noirs qui sont, normalement, moins sensibles au charbon.

Les tableaux d'expériences de M. Müller<sup>1</sup> démontrent que les inoculations successives ne rendaient pas les rats plus résistants, mais au contraire plus sensibles.

Nos animaux succombaient même au premier vaccin injecté sous la peau ; il était donc de toute nécessité de recourir aux inoculations péritonéales qui, grâce aux substances bactéricides contenues dans le péritoine, permettaient à l'animal de se défendre au moins contre le premier vaccin.

Des injections péritonéales successives du premier, du deuxième vaccin, du virus, et enfin du sang de l'animal mort du charbon, nous permirent de rehausser la résistance du rat à tel point, qu'il supportait des inoculations sous-cutanées des cultures les plus virulentes, qui tuaient les témoins en 24-48 heures.

Mais sur 10 rats de la première série, 5 seulement résistèrent définitivement. Les autres succombèrent à différentes époques en partie à la cachexie, en partie à l'infection.

La faute commise consistait évidemment en un passage trop brusque de l'inoculation des vaccins à celle des cultures virulentes, et en un intervalle trop court (5-6 jours) entre les inoculations successives.

Dans la série suivante les 15 rats furent immunisés ainsi :

1 <sup>re</sup>	injection	de	1/5	d'une	culture	sur	gélose	du	premier	vaccin.
2 <sup>e</sup>	injection	après	7	jours	d'	1/4	de	culture	—	
3 <sup>e</sup>	—	7	—	1/2	—	—	—	—	—	
4 <sup>e</sup>	—	10	—	1/4	—	—	—	—	deuxième	vaccin.
5 <sup>e</sup>	—	10	—	1/4	—	—	—	—	—	
6 <sup>e</sup>	—	7	—	1/4	—	—	—	—	—	
7 <sup>e</sup>	—	10	—	1/4	—	—	—	—	virulente	sur
8 <sup>e</sup>	—	10	—	2	gouttes	de	sang	d'un	cobaye,	mort
									du	charbon.

Tous les animaux immunisés par ce procédé résistèrent.

Une fois que le rat a supporté une injection de la culture

1. Müller inoculait sous la peau des cultures sur gélose. Il procédait en laissant un mois d'intervalle entre les deux premières injections et huit jours entre les suivantes.



virulente dans le péritoine, il devient réfractaire contre l'inoculation sous-cutanée de la même culture : c'est pourquoi, dix jours après la dernière injection péritonéale, nous avons pu inoculer à tous les animaux  $1/20$  de culture virulente sur gélose, sans qu'ils y réagissent même par un œdème local.

C'est sur les rats devenus réfractaires à la suite d'inoculations que nous avons fait nos études du mécanisme par lequel l'organisme se défend contre l'infection.

Une expérience comparative d'injection sous-cutanée du virus à un rat immunisé et à un témoin, met en évidence une différence considérable au bout de 3-5 heures ; tandis que chez le témoin il se produit un œdème évident, il n'y en a guère, même au point d'inoculation, chez le rat immunisé.

En même temps, l'examen microscopique de l'exsudat du tissu sous-cutané dévoile une différence très appréciable.

Tandis que chez l'animal immunisé antérieurement on trouve à cette époque une quantité de leucocytes au point d'inoculation et une phagocytose très déterminée, chez le témoin les leucocytes ne se rencontrent que rarement, et parmi eux il y en a peu qui renferment des microbes.

Dans la suite de la maladie, après 12-16 heures, les phénomènes au point d'inoculation se déroulent dans des directions tout à fait opposées. Chez le témoin l'œdème se développe de plus en plus, l'affluence des leucocytes cesse complètement ; ceux qui avaient apparu dans les premières heures sont en voie de désagrégation, et l'exsudat contient une nouvelle génération de bactériidies, entourées de membranes. Chez le rat immunisé on trouve par contre non pas un exsudat clair, mais un liquide épais et purulent, rempli de leucocytes. Chez les animaux bien immunisés, on trouve même plus de leucocytes qu'il n'en faut pour constituer une forte phagocytose : ainsi presque la moitié des leucocytes ne contient pas de bactériidies, et en même temps on n'observe point du tout de microbes libres. Encore après 14 heures, on voit des bactériidies englobées par les leucocytes, et l'on peut obtenir une culture charbonneuse en puisant au point d'inoculation.

De plus, les cobayes ou les rats inoculés par une goutte de cet exsudat, qui ne renferme pas de spores charbonneuses, succombent au charbon.

Ce fait confirme l'assertion de Metchnikoff que les bactériidies englobées par les cellules sont non seulement vivantes, mais encore parfaitement virulentes.

Dans des expériences où nous inoculions, en même temps et avec la même culture, un rat immunisé et réfractaire, un témoin et un troisième rat faiblement immunisé (n'ayant reçu que deux injections du 1<sup>er</sup> vaccin), le rat bien immunisé survivait toujours, tandis que les deux autres succombaient presque simultanément. Mais, dans les premières heures après l'inoculation, on observait chez le rat faiblement immunisé une affluence de leucocytes et une phagocytose. La différence avec ce qui se passait chez le rat réfractaire n'était que quantitative : la leucocytose chez le rat faiblement immunisé était moindre, et la phagocytose restait incomplète : on trouvait des bactériidies libres, dont la membrane se colorait.

Après 24 heures, cet animal avait un œdème presque aussi fort que le témoin, et contenant des quantités de bactériidies libres et de leucocytes en voie de désagrégation. Il est évident que c'est déjà au début de l'immunisation que s'établit la différence dans la sensibilité des leucocytes envers des microbes, contre lesquels l'organisme s'immunise.

Ceci est facile à constater en introduisant, dans le péritoine des rats réfractaires et des témoins, le premier vaccin, qui, comme on sait, ne tue pas la plupart des rats non immunisés, et en examinant comparativement à certains intervalles l'exsudat péritonéal.

On voit alors que la leucocytose s'établit après 15-20 minutes chez l'animal bien immunisé, seulement après 3-4 heures chez le témoin.

L'examen à diverses intervalles de l'œdème des rats immunisés par des injections péritonéales, démontre que, généralement, *la leucocytose s'établit dans la cavité péritonéale d'autant plus vite après l'injection des microbes, que l'animal est plus réfractaire.*

La phagocytose sous-cutanée s'établit si tôt chez les animaux réfractaires, qu'il n'est pas possible de dire s'il existe ou non des substances bactéricides en dehors des cellules ; nous ne trouvons des bactériidies détruites que dans les cellules, et pas de formes dégénérées en dehors.

Nous avons donc fait avec les rats réfractaires des expériences



sur le pouvoir bactéricide de la lymphe, en suivant la méthode employée à ce sujet pour les rats immunisés.

Ces expériences ont montré que *chez les animaux réfractaires, l'exsudat sous-cutané était aussi dépourvu de substances bactéricides que la lymphe des témoins.*

Le sérum des rats réfractaires est bactéricide au même degré que celui des rats non immunisés : il l'est à la proportion de 20 : 1.

Nous n'avons donc pas constaté d'accroissement des substances bactéricides dans le sérum à mesure de l'immunisation.

Par contre, il existe un accroissement indiscutable des propriétés bactéricides de l'exsudat péritonéal des rats vaccinés par injection de cultures dans le péritoine.

Nous n'avons pas déterminé le degré relatif du pouvoir bactéricide hors de l'organisme, parce qu'il est très difficile d'obtenir une quantité suffisante de liquide normal du péritoine.

Mais on peut s'en rendre compte par des expériences sur des animaux. Il a été indiqué dans le 2<sup>e</sup> chapitre que, même chez les rats normaux inoculés par le 2<sup>e</sup> vaccin, les bactériidies ne sont pas toutes tuées hors de cellules par les substances bactéricides : elles résistent en partie et continuent à se développer.

Si on introduit dans le péritoine du rat normal des bactériidies issues d'un animal qui vient de succomber au charbon, on n'observe guère de destruction de ces microbes.

Si l'on introduit ces mêmes bactériidies dans le péritoine du rat immunisé, en les puisant dans le sang d'un cobaye mort de charbon, elles périssent en dehors des cellules tout aussi bien que les bactériidies du 1<sup>er</sup> vaccin chez le témoin.

Nous avons dit que les propriétés bactéricides du sérum des rats immunisés ne s'accroissaient pas et restaient ce qu'elles sont chez les rats non immunisés. Metchnikoff et Roux ont démontré que le sérum bactéricide des rats neufs n'avait aucun pouvoir préventif.

Nous avons comparé le pouvoir préventif du sérum des rats immunisés avec celui du sérum des rats non immunisés. Le sérum de ces derniers, injecté sous la peau, 10 heures avant l'inoculation de la culture, ne modifie nullement le cours de l'infection, et l'animal succombe au charbon en même temps que le témoin.

Par contre, le sérum du rat immunisé, injecté en quantité de 2 c. c. provoquait une leucocytose et une phagocytose au point d'inoculation. Les animaux survivaient 2-4 jours aux témoins. Évidemment la quantité de sérum était insuffisante pour provoquer une phagocytose, assez efficace pour entraver le progrès de l'infection.

Mais ces expériences prouvent que le *sérum des animaux à propriétés bactéricides naturelles devient préventif à mesure de l'immunisation, sans que ses propriétés bactéricides augmentent.*

## VI

ABSENCE DES SUBSTANCES BACTÉRICIDES ET AGGLUTINANTES DANS LE SÉRUM PRÉVENTIF DU CHIEN. — ACTION DU SÉRUM PRÉVENTIF.

La conclusion qui vient d'être exposée est complètement confirmée par l'expérience qui nous permet d'obtenir un sérum préventif de chien.

Au début de l'expérience, le sérum des chiens que nous vaccinions, afin d'obtenir du sérum préventif, n'était ni bactéricide, ni préventif.

Nous commençâmes par leur introduire sous la peau une émulsion de culture du 2<sup>e</sup> vaccin sur gélose. Après 2 injections faites à un intervalle de 10 jours, nous inoculions une émulsion de culture virulente sur gélose âgée de 24 heures, en quantité d'une 1/2 culture à la fois.

Les intervalles entre les injections étaient réglés par la disparition complète au point d'inoculation, non seulement de l'œdème, mais aussi de toute infiltration.

Au début de la vaccination, il faut, pour cela, près de 3 semaines ; ensuite l'infiltration disparaît après 10-15 jours. C'est de cette façon que nous avons vacciné un de nos chiens ; un autre fut inoculé les 5 dernières fois par du sang de cobayes (1 c. c.) morts charbonneux. Tandis que les dernières injections d'émulsion des cultures sur gélose ne provoquaient pas d'œdème, mais seulement une infiltration compacte au point d'inoculation, les injections de sang, provenant d'un passage direct sur un autre animal, provoquaient un fort œdème, s'étendant beaucoup au delà du point d'inoculation.

Nous avons fait 5 injections pareilles à l'un de nos animaux. Il avait d'abord reçu 8 inoculations d'émulsion de culture sur gélose, et ensuite 5 de sang de cobayes charbonneux. Un autre chien fut inoculé 13 fois avec des cultures sur gélose.

Le sérum des chiens était à un certain point préventif déjà avant l'inoculation du sang de cobaye. Injecté sous la peau en quantité de 3 c. c., 24 heures avant l'inoculation du virus, il provoquait une réaction phagocytaire, et les animaux ainsi traités survivaient de 4 à 5 jours aux témoins.

Mais, même injecté en quantité de 6-7 c. c., il ne protégeait pas définitivement les animaux contre le charbon.

Après 5 injections de sang charbonneux, le pouvoir préventif du sérum du 1<sup>er</sup> chiens'accrût tellement que l'injection de 4 c. c. de ce sérum, faite 24 heures avant l'inoculation du virus, rendait l'animal réfractaire.

Après être devenu préventif, le sérum de chien reste aussi peu bactéricide qu'il l'était avant. Donc, *l'accumulation des substances bactéricides dans le sérum n'est pas une condition indispensable à l'existence de la propriété préventive.*

Nous avons fait quelques expériences avec le sérum du chien et du cheval immunisés contre le charbon, afin d'élucider le mécanisme de l'immunité chez les rats inoculés par ces sérums <sup>1</sup>.

Dans ces expériences, nous avons toujours un témoin de poids plus élevé et un rat possédant une immunité active.

En observant, d'heure en heure, ce qui se passe chez les trois rats, on constate que les phénomènes se déroulent sur un même type chez les rats à immunisation active et passive. Au lieu d'œdème au point d'inoculation, on observe une leucocytose, et, après 10-12 heures, une phagocytose complète.

En variant les doses de sérum préventif, on peut produire à volonté une affluence plus ou moins grande de phagocytes au point d'inoculation et, en conséquence, ouvrir diverses issues à la maladie; si la quantité de sérum injecté était insuffisante pour préserver définitivement l'animal, on observait néanmoins une phagocytose complète après 24 heures, et les phénomènes se développaient de même que chez les rats ayant une immunité

1. La première portion, obtenue par nous, de sérum de cheval immunisait définitivement les animaux à la dose de 3 c. c., étant injectée 6-10 heures avant l'inoculation du virus charbonneux.



active. Mais généralement le second jour, chez les rats immunisés activement, on ne trouve plus du tout de bactériidies libres, et même peu de bactériidies englobées dans des cellules de l'exsudat purulent; par contre, chez les rats ayant une immunité passive, on observe l'apparition de bactériidies libres, entourées d'une enveloppe (si la quantité de sérum injecté était insuffisante).

Les bactériidies libres (si elles apparaissent après avoir été englobées par les phagocytes) continuent à se développer de plus en plus, et la quantité de leucocytes de l'exsudat diminue relativement.

L'animal succombe à une infection généralisée 24-48 heures après l'apparition des bactériidies libres. En d'autres termes, il y a analogie complète avec les phénomènes observés chez les rats ayant une immunisation active et ceux qui n'ont pas reçu d'injections préventives suffisantes dans le péritoine.

Admettant la possibilité d'une influence directe du sérum sur les microbes dans l'organisme en cas d'immunité active, nous avons étudié l'influence, sur les bactériidies, de la lymphe œdémateuse des rats inoculés antérieurement par le sérum.

*La lymphe du tissu sous-cutané s'est montrée aussi peu bactéricide dans l'immunité passive, que la lymphe des animaux immunisés activement.*

Nous injections à des rats et à des cobayes neufs une goutte d'exsudat provenant de rats qui avaient été bien immunisés (par une dose de 5-6 c.c. de sérum) et présentaient une phagocytose complète après 24 heures.

Les animaux succombaient au charbon tout aussi bien que leurs témoins, inoculés par l'exsudat des rats charbonneux non immunisés. Les deux exsudats, il est à peine besoin de le dire, ne contenaient pas de spores.

Parallèlement au rat immunisé passivement, nous en inoculions un autre par une plus petite quantité de microbes, qui avaient été exposés à l'étuve pendant une heure à l'influence du sérum préventif du chien. Les rats, inoculés par ce mélange de bactériidies et de sérum préventif, présentaient les mêmes phénomènes morbides et succombaient au charbon tout aussi bien que les témoins, inoculés par une culture ordinaire. Seul le rat immunisé par le sérum résistait.

Les expériences faites *in vitro* avec le sérum préventif de chien démontrèrent l'absence non seulement des substances bactéricides,

mais aussi des substances agglutinantes dans ce sérum. Si l'on mélange du sérum normal d'un chien non immunisé avec un volume égal d'émulsion d'une culture de charbon sur gélose, on observe un phénomène analogue à l'agglutination; après quelques minutes d'exposition à l'étuve, en secouant le tube à essai, on voit les filaments se former en amas. Mais, après 2-3 heures, tout le mélange redevient trouble dès qu'on l'agite. De même le sérum préventif du chien vacciné ne produit pas l'agglutination des bactéries.

Le sérum préventif du cheval produit une agglutination de la culture charbonneuse *in vitro*; il est aussi bactéricide, comme nous l'avons indiqué. Mais le sérum du cheval non vacciné produit aussi une agglutination.

Ces expériences prouvent que le sérum préventif qui provoque une phagocytose, défendant l'organisme contre l'infection, ne doit pas nécessairement contenir des substances agissant directement sur les microbes, soit dans l'organisme, soit *in vitro*.

Des expériences furent faites avec le sérum d'un chien immunisé, sérum qui fut employé le lendemain de la 5<sup>e</sup> inoculation de sang charbonneux, quand le chien avait encore un fort œdème. En inoculant ce sérum à des animaux, nous obtenions un œdème très appréciable au point d'inoculation. Par contre, le sérum du même chien ne provoquait aucun œdème 20 jours plus tard.

La puissance préventive du premier sérum était donc plus faible que celle du second. Nous avons obtenu d'un cheval, une semaine après lui avoir fait la dernière inoculation du charbon, du sérum qui provoquait un œdème au point d'inoculation; son pouvoir préventif était presque nul.

Quatre semaines après l'inoculation, ce même cheval fournissait un sérum qui ne provoquait plus d'œdème, mais qui était considérablement préventif.

Ces expériences permettent de supposer qu'il existe dans l'organisme de l'animal charbonneux une toxine, et que c'est elle qui provoque un œdème au point d'inoculation, semblable à l'œdème des animaux vaccinés contre le charbon.

En chauffant ce sérum pendant un quart d'heure à 65°, on détruit sa propriété de provoquer un œdème ainsi que sa propriété préventive. Ainsi, en injectant à un rat 5 c. c. de sérum chauffé à 65°, et à un autre la même quantité du même sérum, mais

non chauffé, et en inoculant 12 heures après ces deux animaux et un témoin par le charbon, nous obtenions les résultats suivants : le rat inoculé par le sérum non chauffé présentait une phagocytose et il guérissait, tandis que les deux autres avaient des œdèmes, pas de phagocytose, et succombaient au charbon.

Nous avons dit plus haut que le sérum préventif, obtenu d'un animal qui avait été inoculé pour la dernière fois 2 semaines avant, ne provoquait pas d'œdème, étant injecté à d'autres animaux. Évidemment, la substance toxique disparaît peu à peu de l'organisme, ainsi que c'est le cas pour les toxines diphtérique et tétanique dans l'organisme qui leur devient réfractaire.

D'un autre côté, l'étude de certaines particularités des phénomènes morbides chez les animaux passivement immunisés et inoculés par le charbon, permettent de supposer qu'à mesure de la disparition de la toxine charbonneuse dans l'organisme, il s'y produit une accumulation de substances antitoxiques.

Nous avons vu qu'un rat, immunisé par une quantité suffisante (3-4 c. c.) de sérum préventif, et 12 heures après inoculé du charbon, guérissait en présentant une phagocytose et pas du tout d'œdème au point d'inoculation. On peut expliquer l'absence d'œdème, dans ce cas, en admettant que les bactériidies englobées ne peuvent sécréter leurs toxines hors des cellules.

Mais si la quantité de sérum préventif n'avait pas été suffisante, les bactériidies continuaient à se développer, malgré la phagocytose passagère, et l'animal finissait par succomber à l'infection généralisée, comme nous l'avons décrit plus haut.

C'est précisément sur ces animaux, ayant reçu une immunisation passive insuffisante et succombant au charbon, que nous avons observé néanmoins une différence très marquée avec des témoins. Chez le rat neuf inoculé du charbon, on observe un œdème énorme, qui s'étale sur le dos et le ventre, bien au-delà du point d'inoculation. Par contre, chez les rats passivement immunisés, même chez ceux qui présentent un développement extra-cellulaire de bactériidies libres et qui finissent par succomber, l'œdème est toujours insignifiant, parfois à peine sensible. Il y a une telle quantité de bactériidies dans cet œdème, que la goutte d'exsudat qu'on y puise est toujours tout à fait trouble, tandis que l'exsudat du témoin est complètement transparent, car il ne contient relativement que peu de microbes.



# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PROCESSUS LEUCOCYTAIRE DANS LA MALARIA

PAR M. H. VINCENT

Médecin-major de deuxième classe, professeur agrégé au Val-de-Grâce.

---

## I

Tous les observateurs qui ont eu l'occasion d'étudier les modifications histologiques du sang dans le cours de la malaria ont constaté la présence des leucocytes mélanifères : à la suite de la découverte de l'hématozoaire du paludisme, on a pu, naturellement, regarder comme un résidu de la digestion du parasite les granulations pigmentaires contenues dans les globules blancs. L'inclusion intra-cellulaire des plasmodies a été, du reste, observée par divers savants (Laveran, Golgi, Bastianelli, Marchiafava et Celli, etc.). Mais les rapports qu'affecte ce phénomène avec les diverses phases des accès palustres n'ont pas encore été entièrement déterminés.

Le nombre et la nature des éléments leucocytaires offrent, en effet, dans le cours des fièvres paludéennes, des variations importantes. Les modifications quantitatives de ces cellules ont été étudiées, pour la première fois, par M. Kelsch <sup>1</sup>. En pratiquant la numération comparée des cellules blanches et des hématies, M. Kelsch a signalé que, une à plusieurs heures, en moyenne, après le début de la fièvre, la proportion relative des leucocytes diminue considérablement. C'est ainsi que, dans un cas de fièvre tierce, une demi-heure après le frisson, qui durait encore, la proportion comparée des globules blancs aux globules rouges était de  $\frac{1}{1231}$  ; une heure après elle était descendue à  $\frac{1}{1515}$ . Dans un cas de fièvre irrégulière, 10 minutes après le début de l'accès, il y avait 1 globule blanc pour 872 rouges :

1. A. A. KELSCH, Nouv. contrib. à l'anat. pathol. des maladies paludéennes endémiques. *Arch. de Physiologie norm. et pathol.*, 1876, III, p. 490.

30 minutes après, 1 pour 904. Le chiffre des globules blancs se réduit donc, en quelques heures, de la moitié ou du tiers de ce qu'il était antérieurement, et il ne se relève que dans les jours qui suivent.

Ces travaux ont été confirmés par Dionisi<sup>1</sup>, qui a vu le chiffre des globules blancs descendre même, dans certains cas, à  $\frac{1}{2065}$ ,  $\frac{1}{2460}$ ,  $\frac{1}{4140}$ .

Enfin, dans un mémoire important, Bastianelli<sup>2</sup> a étudié la morphologie des diverses formes de leucocytes que l'on observe dans les accès paludéens irréguliers ou graves. Il y a augmentation des cellules uninucléées et diminution des éléments multinucléés. L'administration de la quinine provoque une augmentation des phagocytes, parallèlement à une diminution des parasites du sang. La fonction phagocytaire appartient principalement, dans le paludisme, d'après Metchnikoff<sup>3</sup>, aux macrophages du foie et de la rate, qui peuvent englober des quantités surprenantes d'hématozoaires.

J'ai moi-même eu l'occasion d'observer, à Alger, un grand nombre de malades atteints d'impaludisme. L'examen du sang, à diverses périodes de l'accès dans les fièvres régulières, a révélé des variations intéressantes dans le nombre et la nature des leucocytes. Sur ce point, les recherches ont porté plus spécialement sur 12 cas de fièvre intermittente régulière : 8 de fièvre quotidienne, 2 de fièvre quarte, 2 de fièvre tierce.

Dans ces divers cas, les examens et les numérations ont été faits sur du sang recueilli à intervalles rapprochés (toutes les 8 à 10 minutes, en moyenne) : 1° peu avant le début de l'accès ; 2° au début et pendant le stade de frisson ; 3° dans la période de chaleur ; 4° le lendemain de l'accès. Pour faciliter ces numérations fréquentes et, par là même, assez laborieuses, il a été procédé comme il suit : on préparait de petits tubes de verre fermés avec des bouchons paraffinés, et dans lesquels on versait d'avance 100 gouttes de sérum artificiel d'Hayem. Les pipettes correspondantes, ayant servi à jauger ces gouttes, étaient ensuite utilisées pour la prise du sang. Chaque goutte de sang, recueillie

1. DIONISI, *Le variaz. numer. dei glob. bianchi in rapp. coi parassiti d. malaria. Lo Sperimentale*, 1891, p. 284.

2. BASTIANELLI, *I leucociti nell' infez. malar.*, *R. Accad. med. di Roma*, V. 1892.

3. METCHNIKOFF, *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1887, p. 328.

par piqure du lobule de l'oreille, aux diverses phases de l'accès de fièvre intermittente, était versée dans un godet et mélangée aussitôt au sérum. La numération comparée des globules blancs et des globules rouges était faite ultérieurement à l'aide du compte globules de Malassez.

L'examen du sang, à l'état frais, a toujours été pratiqué concurremment, sans dilution préalable.

Voici les résultats fournis par ces examens :

OBSERVATION n° 1. — *Man...*, 21 ans, entré le 9 octobre 1894 à l'hôpital du Dey. Fièvre intermittente quotidienne, 3<sup>e</sup> récursive. Anémie profonde. Rate hypertrophiée. Les accès apparaissent chaque jour vers 11 heures du matin.

Le sang est examiné le 11 octobre.

HEURE.	T.	GLOBULES ROUGES.	GLOBULES BLANCS.	RAPPORTS DES GLOB. BLANCS AUX GLOBULES ROUGES.
10 <sup>h</sup> matin .....	37°...	2.900.000..	3.800.....	$\frac{4}{869}$
10 <sup>h</sup> 35 .....	37°..	» ..	4.100.....	
10 <sup>h</sup> 55 .....	37°4..	» ..	3.990. .	
11 <sup>h</sup> (malaise).....	37°9..	» ..	4.650.....	
11 <sup>h</sup> 05 (horripilations) . .	38°3..	» ..	4.220. . .	
11 <sup>h</sup> 09 (violent frisson)...	39°4..	» ..	4.960.....	
11 <sup>h</sup> 15 .....	39°4..	» ..	10.600.....	$\frac{1}{273}$
11 <sup>h</sup> 35 (frisson a cessé)...	39°3..	» ..	3.700.....	$\frac{1}{761}$
11 <sup>h</sup> 45 .....	39°3..	» ..	2.970.....	
2 <sup>h</sup> soir .....	38°2..	» ..	2.900.....	$\frac{1}{968}$
12 oct. 7 <sup>h</sup> matin ..	36°8..	» ..	3.400.....	$\frac{1}{823}$

Il y a donc eu, dans ce cas, une augmentation subite et tout à fait éphémère des leucocytes qui, de 4,960 au début du premier frisson, ont passé, en quelques minutes, au chiffre de 10,600. Ce n'est pas au début même de l'accès, mais seulement 6 minutes après, que le nombre des leucocytes semble, dans ce cas, avoir atteint son maximum. S'il eût été possible de multiplier davantage les examens, peut-être la leucocytose se serait-elle manifestée un peu plus tôt. Remarquons également combien la multiplication leucocytaire a été brève puisque, 20 minutes après, le nombre des globules blancs était redescendu à son chiffre primitif et même au-dessous de lui. C'est à la fin de l'accès que ce chiffre a atteint son minimum (2,900), de même que c'est au commencement de l'accès qu'il était à son maximum.

L'examen du sang de *Man...*, à l'état frais, a montré de nombreuses amibes libres, abondantes surtout à la période de grand frisson. On pouvait en compter 2 et même 3 dans certains champs du microscope. Quelques hémocytes petits, non pigmentés.

Observation n° 2. — Elle concerne un nommé *Pel...*, âgé de 22 ans, qui



contracta pour la première fois la fièvre intermittente au printemps de 1894, et entra à l'hôpital du Dey au mois d'octobre de la même année. C'était un sujet assez vigoureux, quoique un peu anémié, ayant, depuis près d'un mois, des accès quotidiens qui débutaient vers 5 heures de l'après-midi.

Sang examiné le 17 octobre.

HEURE.	T.	GLOBULES ROUGES.	GLOBULES BLANCS.	RAPPORT DES GLOB. BLANCS AUX GLOBULES ROUGES.
4h soir .....	36°9..	4.000.000.	5.800.....	$\frac{1}{689}$
4h20 .....	36°9..	» ..	5.620.....	
4h32 .....	37° ..	» ..	5.160.....	
4h40 .....	37° ..	» ..	5.850.....	
4h54 (céphalée et friss. léger)	38° ..	» ..	4.970.....	$\frac{1}{805}$
5h (frisson continue)..	39° ..	» ..	5.200.....	$\frac{1}{769}$
5h 5 id. ..	39°4.	» ..	6.860.....	$\frac{1}{583}$
5h12 (frisson cesse)....	39°4..	» ..	4.340.....	$\frac{1}{921}$
5h28 .....	» ..	» ..	3.870.....	$\frac{1}{1034}$
6h .....	» ..	» ..	2.900.....	$\frac{1}{1378}$
18 oct. 10h matin .....	36°6..	3.828.000..	4.130.....	$\frac{1}{926}$

Comme dans le cas n° 1, la leucocytose a été très fugace, elle a été cependant moins marquée, puisque le chiffre des globules blancs a monté de 4,970 (chiffre minimum avant l'accès) à 6,860 seulement. Nous ferons ressortir la diminution considérable des leucocytes dans le sang, pendant le stade de chaleur. Elle vient encore à l'appui des recherches de M. Kelsch.

Le sang de ce malade renfermait un petit nombre de formes amiboïdes libres; ce malade avait été traité, à plusieurs reprises, par la quinine, avant d'entrer à l'hôpital.

*Observation n° 3.* — Voici un autre cas de fièvre intermittente quotidienne, non traitée. Le malade, *Level...*, âgé de 20 ans, entra au Dey le 22 octobre 1894. Sujet maigre, de constitution un peu au-dessous de la moyenne; rate hypertrophiée, un peu douloureuse. Les accès apparaissaient régulièrement vers 10 heures du matin.

HEURE.	T.	GLOBULES ROUGES.	GLOBULES BLANCS.	RAPPORT DES GLOB. BLANCS AUX GLOBULES ROUGES.
9h29 matin .....	36°9..	3.769.000..	3.800.....	$\frac{1}{988}$
9h40 .....	37°1..	» ..	3.990.....	
9h52 .....	» ..	» ..	3.470.....	
10h08 (violent frisson)...	39°7..	» ..	10.800.....	$\frac{1}{349}$
10h16 .....	39°9.	» ..	5.620. ....	$\frac{1}{668}$

10h35	(frisson a cessé)...	40° ..	» ..	3.100.....	$\frac{1}{1212}$
11h	.....	»	» ..	2.840.....	$\frac{1}{1324}$
4h soir	(sueurs).....	38°2	» ..	2.300.....	$\frac{1}{1634}$
24 oct. 7h30 matin	.....	36°7	» ..	1.820.....	$\frac{1}{780}$

Résumons plus brièvement les résultats donnés par l'examen du sang dans les autres cas de fièvre quotidienne.

## PROPORTION DES GLOBULES BLANCS AUX GLOBULES ROUGES :

OBSERVATION.	1 HEURE A 30' AVANT L'ACCÈS.	AU DÉBUT DU FRISSON.	STADE DE CHALEUR.	18 A 28 HEURES APRÈS.
N° 4 : Buss., 21 ans, 17 septembre 1894.	$\frac{1}{646}$	$\frac{1}{516}$	$\frac{1}{876}$	$\frac{1}{820}$ <sup>1</sup>
N° 5 : Gouj., 20 ans, 9 juin 1894.	$\frac{1}{660}$	$\frac{1}{680}$	$\frac{1}{1240}$	»
N° 6 : Lat., 22 ans, 8 octobre 1894	$\frac{1}{730}$	$\frac{1}{730}$	$\frac{1}{1062}$	$\frac{1}{1140}$
N° 7 : Rainb., , 13 octobre 1894.	$\frac{1}{620}$	$\frac{1}{436}$	$\frac{1}{770}$	$\frac{1}{1640}$
N° 8 : Rec., 22 ans, 27 août 1894.	»	$\frac{1}{448}$	»	$\frac{1}{860}$ <sup>2</sup>

Il résulte donc des observations ci-dessus, que d'une manière générale, le chiffre des leucocytes subit, dans l'accès de fièvre régulière, des oscillations remarquables. Il s'élève brusquement, pendant quelques minutes, au début même de l'accès et pendant la période de frisson. Il s'abaisse ensuite, à un degré parfois considérable, soit pendant la période de chaleur ou à la fin de l'accès, soit le lendemain. Lorsque la quinine a été donnée préventivement, le nombre des globules blancs se relève (*cas nos 4 et 8 en particulier*) et cette constatation vient confirmer celle qu'avait faite Bastianelli <sup>3</sup>.

Il importe de faire remarquer, cependant, que le dénombrement des leucocytes ne révèle, dans quelques cas, qu'une augmentation minime de ces éléments cellulaires. Dans le cas n° 5, même, non seulement leur chiffre n'a pas augmenté, mais il paraît avoir légèrement diminué pendant la période

1. Quinine dans la nuit.

2. Quinine pris préventivement contre l'accès suivant

 3. *Loc. cit.*

habituelle de leucocytose, c'est-à-dire au début même de la fièvre. Peut-être la crise leucocytaire a-t-elle été trop fugace et aura-t-elle échappé à des examens nécessairement un peu espacés ?

Cette leucocytose, qui paraît si fréquente au début de l'accès de fièvre, a été observée et signalée par M. Kelsch chez certains malades. « Dans quelques cas où il m'a été possible de faire la numération dès le début de l'accès, il m'a semblé qu'il y avait, à ce moment, une augmentation légère, mais instantanée des leucocytes <sup>1</sup> ».

C'est, peut-être, dans les fièvres régulières à accès plus éloignés, telles que la fièvre tierce et la quarte, que ce phénomène de leucocytose initiale a été le plus remarquable.

*Observation n° 9.* — X., détenu aux ateliers de travaux publics, juin 1894. Paludisme ancien; fièvre tierce, 3<sup>e</sup> accès. Début des accès vers 9 heures du matin. T = 40°,6 en moyenne.

A 8 h. 45, le malade éprouve un certain malaise et sent que son accès approche. La numération comparée des globules blancs et des globules rouges donne, à ce moment, le rapport  $\frac{1}{369}$ .

A 9 heures, la proportion est de  $\frac{1}{420}$ .

Le frisson initial apparaît à 9 h. 10. Le sang, prélevé exactement au premier frisson, donne le rapport  $\frac{1}{276}$ . A ce moment, T = 40°, 6. Il y a donc eu, dans ce cas, une augmentation subite et considérable des leucocytes, mais elle dure peu.

A 9 h. 25, les globules blancs sont aux globules rouges comme  $\frac{1}{740}$ .

A 9 h. 45, le rapport n'est plus que de  $\frac{1}{1065}$ .

Le sang renfermait quelques amibes libres, petites, et de nombreux corps en rosace à 9 segments.

*Observation n° 10.* — Troc..., 21 ans, salle 4, lit 25.

Sang examiné le 23 août 1895.

40 minutes avant l'accès, le rapport.....	$\frac{G. B.}{G. R.} = \frac{1}{586}$
6 minutes avant.....	» $\frac{1}{540}$
Début de la fièvre (T = 40°,9).....	» $\frac{1}{302}$
20 minutes après le début.....	» $\frac{1}{960}$
17 heures après.....	» $\frac{1}{990}$

1. A. KELSCH, *loc. cit.*, p. 314.



Deux cas de fièvre quarte ont été étudiés au même point de vue. Dans ces deux cas, principalement dans l'un d'eux, le sang a présenté une leucocytose manifeste dès le début de l'accès.

1 heure avant l'accès.....	$\frac{G. B.}{G. R.} = \frac{1}{311}$
36 minutes avant l'accès.....	" $\frac{1}{312}$
Frisson initial (T = 39°,6).....	" $\frac{1}{312}$
25 minutes après celui-ci.....	" $\frac{1}{699}$
1 heure 15 après.....	" $\frac{1}{1130}$
20 heures après.....	" $\frac{1}{940}$

En résumé, dans la fièvre quotidienne régulière, dans la fièvre tierce et dans la fièvre quarte, les examens fréquents du sang permettent de constater le plus souvent, *au début même* de l'accès, une leucocytose parfois considérable. Celle-ci s'évanouit rapidement et peut même, tant elle est brève, passer inaperçue. Elle fait place alors à une hypoleucocytose telle que le chiffre des globules blancs peut devenir, dans certains cas, deux ou trois fois moins élevé qu'avant l'accès, et s'abaisser encore le lendemain si le malade n'a pas pris de quinine. La multiplication initiale des leucocytes et leur diminution ultérieure sont si caractéristiques qu'il est parfois possible, au simple examen d'une préparation de sang, de déterminer la période à laquelle le sang a été prélevé.

Cette leucocytose n'est point un phénomène spécial à la malaria. On sait qu'elle se retrouve dans d'autres maladies infectieuses, la pneumonie par exemple, dans laquelle la courbe leucocytaire suit parallèlement la courbe thermique et s'abaisse au moment de la défervescence (Hayem et Gilbert). Elle existe encore dans le phlegmon, etc. Dans la fièvre intermittente régulière, l'invasion du sang par l'hématozoaire et la multiplication des leucocytes semblent donc évoluer *pari passu*. De même que l'offense, localisée en un point de l'organisme par l'évolution d'un foyer microbien, provoque en ce point l'afflux de leucocytes appelés à combattre l'agent parasitaire, ainsi

l'apparition, en proportion anormale, de l'hématozoaire dans le sang éveille au moment de l'accès une sorte d'explosion leucocytaire ayant le même objet. Ainsi s'explique l'abondance momentanée des cellules blanches issues de la rate, des ganglions lymphatiques, etc., et déversées subitement dans le torrent circulatoire. La constatation de la nature de ces formes leucocytaires n'est pas indifférente à étudier. Ainsi que nous allons le voir, en effet, ce sont surtout les cellules mononucléaires qui remplissent, dans la malaria, la principale fonction phagocytaire.

## II

Si on compare, au point de vue de la nature des leucocytes, le sang d'un sujet normal et celui d'un paludéen, on constate des différences assez notables. Bastianelli a déjà insisté sur la multiplication des cellules uninucléées et la diminution des leucocytes polynucléés dans le sang d'un malade atteint de fièvre pernicieuse comateuse.

D'après Ehrlich, Eichhorn, Hayem, les leucocytes à noyau palmé fortement chromophile existent dans le sang normal dans la proportion de 20 à 25 p. 100; les lymphocytes et les cellules éosinophiles, de 5 p. 100. Que deviennent ces mêmes éléments dans l'accès de fièvre intermittente?

Au début de l'accès et au moment où se produit la crise leucocytaire précédemment signalée, il y a une *augmentation notable du chiffre des lymphocytes* et, à un degré moindre, de celui des *cellules éosinophiles* et des *grandes cellules uninucléaires* (macrophages). Un peu plus tard, 45 à 60 minutes après, en moyenne, les lymphocytes demeurent encore beaucoup plus nombreux que normalement; les cellules éosinophiles sont descendues à la normale et les grandes cellules uninucléaires sont devenues très rares. Ce dernier phénomène est vraisemblablement en rapport avec les fonctions phagocytaires spéciales de ces cellules, dans la malaria. Car ce sont principalement ces cellules que l'on rencontre, au début de l'accès, contenant des amibes ou truffées de pigment mélanique. Les glandes lymphatiques, le foie et la rate les arrêtent alors au passage et en débarrassent le sang.

Quant aux cellules multinucléaires, leur nombre paraît varier faiblement dans l'accès palustre, bien qu'il diminue un

peu. Nous rappellerons que ces cellules ne jouent qu'un rôle phagocytaire restreint dans l'impaludisme (Metchnikoff). Il résulte de là que l'accroissement momentané du chiffre des globules blancs, que nous avons signalé dans le stade de frisson, paraît être la conséquence de l'afflux inusité des jeunes cellules ou lymphocytes émigrés de la rate et des ganglions lymphatiques. La multiplication non douteuse des cellules éosinophiles révèle un travail analogue dans la moelle osseuse, et celle des grands macrophages, dans la rate et le foie.

*Observation n° 12.* — Fièvre intermittente quotidienne. Sang recueilli 5 minutes après le frisson initial.

			Proportion normale d'après Jolly <sup>1</sup> .
Cellules polynucléaires.....	56 = 54,90	p. 100	60 p. 100
Lymphocytes.....	22 = 21,56	» —	2,2 » —
Grandes et moy. cell. uninucl...	14 = 13,72	» —	36,3 » —
Cellules éosinophiles.....	10 = 9,80	» —	1,4 » —

*Observation n° 13.* — Fièvre intermittente quotidienne, 3<sup>e</sup> accès. Sang recueilli au début du frisson et une heure après celui-ci.

	DÉBUT DE L'ACCÈS (T = 40°, 1)	1 HEURE APRÈS (T = 40°, 2)
Cellules multinucléaires.....	30 = 46,1 p. 100	48 = 54,5 p. 100
Lymphocytes.....	21 = 32,3 —	10 = 30,3 —
Grandes et moy. cell. mononucl.	8 = 12,3 —	4 = 12,1 —
Cellules éosinophiles.....	6 = 9,2 —	1 = 3, —

Enfin, dans les fièvres régulières à accès espacés, telles que la quarte, les lymphocytes subissent une augmentation aussi anormale. C'est ce que l'on pourra constater encore dans le cas suivant.

*Observation n° 14.* — Fièvre quarte ancienne, traitée à intervalles réguliers par la quinine. Le sang renferme de nombreux corps segmentés et quelques amibes petites, à pigment collecté au centre du parasite. Très peu d'hémocytes.

Sang prélevé au début de l'accès (39°, 8) :  $\frac{G R}{G R} = \frac{1}{390}$

Cellules multinucléaires.....	37 = 49,33	p. 100
Lymphocytes.....	26 = 34,66	» —
Grandes et moy. cell. uninucl.....	9 = 12	» —
Cellules éosinophiles.....	3 = 4	» —

Dans ce cas, les cellules éosinophiles n'avaient subi qu'une augmentation très faible.

1. JOLLY, *Soc. de biol.* 23 oct., 1897.



## III

Contrairement à ce qu'on observe dans les infections bactériennes, où la fonction phagocytaire appartient principalement aux leucocytes polynucléaires, l'englobement de l'hématozoaire de Laveran appartient presque exclusivement aux cellules à noyau unique (micro et macrophages). Bien que le fait soit rare, et qu'il ait été même nié par M. Metchnikoff<sup>1</sup>, les petits lymphocytes ont aussi la propriété d'absorber le parasite de la malaria (fig. 1, *d*). Par contre, les cellules éosinophiles paraissent incapables de remplir les fonctions phagocytaires.

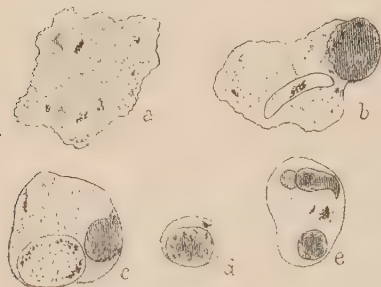


FIG. 1. — Leucocytes mélanifères et inclusions parasitaires : *a*) Leucocyte ayant englobé cinq hématozoaires dont il ne reste que le pigment entouré d'une auréole claire. Le noyau de la cellule est détruit, sa chromatine s'est diffusée dans le protoplasme cellulaire; *b*) Macrophage de la rate ayant englobé un croissant; *c*) Macrophage amibifère; *d* et *e*) Microcyte et cellule polynucléaires ayant exceptionnellement englobé un parasite.

Dans la malaria, la phagocytose se traduit par la présence, dans les cellules mononucléées, de un ou plusieurs grains de pigment fréquemment entourés d'une auréole claire, et qui sont les résidus de la digestion du parasite (fig. 1). Malgré le volume relativement grand des amibes, une même cellule peut en absorber plusieurs (Metchnikoff). On peut quelquefois en constater jusqu'à 4 ou 5 dans un même leucocyte (fig. 1 *a*). Le protoplasma

du parasite est digéré, et son pigment condensé en un bloc souvent unique.

De toutes les formes que peut présenter l'hématozoaire, c'est la forme amiboïde, libre ou intraglobulaire, qui est la plus accessible aux phagocytes. On rencontre plus rarement des corps segmentés dans l'intérieur des globules blancs.

Je n'ai jamais observé, dans le sang, de formes en croissant contenues dans un leucocyte. Dans certains cas d'accès pernicieux, où la pulpe splénique était riche en corps en croissant, ces derniers étaient toujours libres. Une fois seulement, l'inclusion d'un corps en croissant a été constatée dans un macrophage de

1. METCHNIKOFF, *Lec. sur l'Inflammation*, p. 436, Paris, 1891.

la rate (fig. 1, *b.*). Cette forme de parasite semble donc n'exercer aucune influence attractive sur les leucocytes, et cette particularité, jointe à la grande résistance des corps falciformes, explique sans doute la ténacité de fièvres anciennes où les *Laverania* existent en tout temps dans le sang et dans la rate, sans même provoquer de rupture de l'équilibre thermique.

Les cellules phagocytaires de l'hématozoaire ont surtout leur origine dans le foie et la rate. Il en résulte que, lorsque le foyer principal de formation de ces cellules, la rate, se trouve arrêté dans son fonctionnement, on peut voir subitement survenir un accès pernicieux que rien ne semblait faire présager. Tel est le cas qui s'est présenté chez l'un de nos malades, et qui offre, à cet égard, un certain intérêt. Ce malade, nommé *Nous...*, avait été rapatrié de Madagascar, le 21 août 1895, pour anémie palustre. Le sang examiné montrait de très rares amibes et une leucocytose assez abondante. Il survint, au bout de quelques jours, une infection colibacillaire dont le sujet finit cependant par guérir. La fièvre avait complètement disparu, l'appétit était revenu, lorsque la guérison fut brusquement interrompue par un accès pernicieux qui emporta le malade en deux heures. A l'autopsie, on trouva, dans la rate, un abcès enkysté qui avait détruit la presque totalité du viscère et n'en avait respecté qu'une portion infime, fortement mélanique, à peine 8 ou 10 grammes. L'examen microscopique du parenchyme resté sain, montra une quantité prodigieuse d'hématozoaires (formes amibiennes et corps en croissant); on en comptait plus de 30 par champ du microscope. L'abcès ne contenait que le colibacille.

#### IV

L'englobement de l'hématozoaire par les cellules lymphatiques soulève encore une question. On ne sait point encore, en effet, d'une manière certaine, si l'absorption des plasmodies a lieu après la mort ou l'atténuation de ces parasites, ou bien si les leucocytes ont la propriété de les englober à l'état vivant. M. Laveran a vu, à l'examen direct du sang, des leucocytes qui, accolés à des éléments parasitaires, étaient en train de les absorber<sup>1</sup>. Golgi admet que les leucocytes peuvent englober les hématozoaires vivants, en se fondant sur ce que les cellules renferment

1. A. LAVERAN, *Du palud., et de son hématozoaire*. Paris, 1891., p. 180.

parfois des plasmodies arrivées à un complet état de développement ou même sur le point d'effectuer leur segmentation. Mais Golgi paraît se rendre compte du peu de valeur de ses arguments, car il ajoute « qu'une telle controverse téléologique ne peut avoir, dans la malaria, aucune solution possible »<sup>1</sup>.

Cette solution peut cependant être fournie. La mobilité de l'hématozoaire, sous sa forme amibienne, et les mouvements extrêmement rapides que présentent, parfois aussi, les granulations pigmentaires dans l'intérieur de l'amibe, sont, en effet, des phénomènes caractéristiques de la vie de ces parasites. C'est pourquoi j'ai recherché, en multipliant les examens du sang à l'état frais, si cette double mobilité ne pouvait pas être observée dans les amibes intraleucocytaires.

Or, cette constatation a pu être faite, d'une première manière, dans le sang de 3 malades. Il a été rencontré, dans ces 3 cas, une amibe intacte, à contours très nets, et dans laquelle les grains pigmentaires s'agitaient avec une très grande vivacité : le parasite avait été, sans nul doute, récemment englouti (fig. 2).



FIG. 2. — Fièvre intermittente quarte, tierce et quotidienne; trois cellules contenant des amibes vivantes, dont le pigment était très mobile.

Une des préparations montrait, dans le même champ du microscope, une amibe intraleucocytaire, à grains de pigment très mo-

biles, et une autre amibe libre, à pigment immobile. Une gouttelette de bleu de méthylène fut déposée sur le bord de la lamelle; lorsque la matière colorante atteignit l'amibe, on vit apparaître presque aussitôt, sous le microscope, des mouvements rapides de son pigment, identiques à ceux de l'amibe intracellulaire voisine. Au bout d'une minute, le leucocyte se laissa pénétrer à son tour par le bleu de méthylène et son noyau devint bleu. Mais la mobilité du pigment de l'une et de l'autre amibe persista encore, quoique en s'affaiblissant de plus en plus, pendant près de 3 minutes. Puis les parasites se laissèrent colorer. Il n'est peut-être pas invraisemblable d'admettre que les mouvements du pigment, brassé dans le corps du parasite, traduisent un état de souffrance de celui-ci, comme peuvent en

1. GOLGI, *Loc. cit.* et *Gazzeta dei Ospedali*, n° 53, 1886.



causer, artificiellement ou non, la dessiccation, la lumière, l'action digestive des phagocytes, le bleu de méthylène, etc.

Dans des circonstances un peu plus spéciales où j'ai tenté de cultiver l'hématozoaire du paludisme, j'ai pu constater une nouvelle preuve de l'englobement du parasite à l'état vivant.

Des essais de culture de l'hématozoaire dans le sang même du malade furent faits de la manière suivante. Le sang, retiré aseptiquement, était déposé en couche mince entre une lame et une lamelle stérilisées. Les préparations, lutées à la paraffine, étaient conservées dans une chambre humide, soit à l'étuve à 32°, soit à la température du laboratoire. Dans les cas les plus ordinaires, ces préparations, examinées après quelques heures, ne montrent que des leucocytes altérés, granuleux, ou bien renfermant des vacuoles inégales, translucides et arrondies, de teinte légèrement rosée. Les grains pigmentaires des cellules mélanifères, la vacuole qui les entoure, ne sont nullement modifiés.

Or, dans un cas de fièvre intermittente quarte ancienne, les préparations, examinées 8 heures après, montraient plusieurs formes amiboïdes intraleucocytaires dans lesquelles les granulations pigmentaires étaient mobiles (fig. 3). Ces mouvements



FIG. 3. — Fièvre intermittente quarte ancienne. Préparation de sang conservé à la chambre humide et examiné huit heures après. Trois leucocytes morts renfermant des amibes vivantes, et dont le pigment était mobile. Il ne s'agissait pas de mouvement brownien : ceux-ci sont très rapides et ne se produisent que sur des granulations ou des éléments dont les dimensions ne dépassent pas 2 à 4  $\mu$ , en moyenne.

avaient disparu au bout de 11 heures. Il était donc incontestable que les amibes avaient été englobées à l'état vivant. Il est digne de remarque que la préparation, avant sa mise à l'étuve, avait été soigneusement explorée et il n'avait pas été constaté, à ce moment, de parasites intraleucocytaires. Ceux-ci étaient-ils passés inaperçus ? Ou bien, s'agissait-il d'amibes qui s'étaient

développées et agrandies dans le leucocyte lui-même, dans le sang conservé à l'étuve ?

S'il ne nous était pas permis de conclure dans le cas qui précède, il n'en a pas été de même à propos des deux cas qui suivent, l'un de fièvre tierce, l'autre de fièvre quarte, dans lesquels il y a eu certainement croissance et développement des amibes dans les globules blancs.

Dans le cas de fièvre intermittente tierce, ancienne, le sang avait été recueilli au premier frisson ; la température du malade était à ce moment, très élevée : 41°.5. Les préparations, faites et

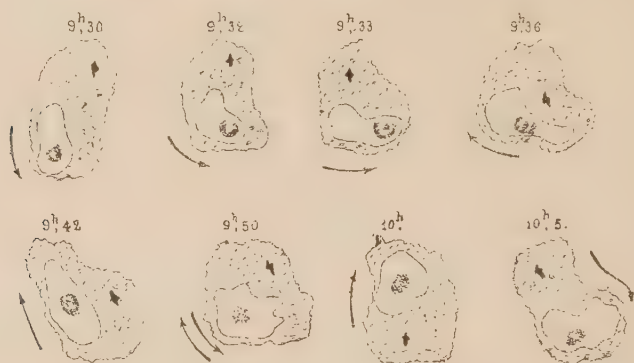


FIG. 4 — Fièvre intermittente tierce, ancienne. Essai de culture de l'hématozoaire. Préparation de sang conservé dans la chambre humide. Sang examiné vingt-deux heures après la prise. Amibe pigmentée se déplaçant dans un leucocyte mort et refoulant par ses mouvements un amas de pigment, résidu d'une autre amibe digérée par le leucocyte.

conservées comme il est dit ci-dessus, avaient été minutieusement examinées aussitôt après la prise du sang et n'avaient rien montré d'anormal. Elles renfermaient seulement des corps en rosace assez nombreux, et des amibes petites, libres. Pas de parasite intraleucocytaire, mais seulement quelques leucocytes mélanifères.

Ces préparations furent examinées 22 heures après. Or, chose remarquable, un certain nombre de leucocytes qui, au moment de la prise du sang, ne renfermaient que quelques grains de pigment, mais aucun hématozoaire apparent, aucun corps suspect, présentaient, après 22 heures, dans leur intérieur, des cellules sphériques, ovoïdes ou irrégulières, munies de prolongements ; leurs contours étaient très nets. Leur protoplasme

hyalin tranchait sur le résidu granuleux du leucocyte. Au centre de ces éléments amiboïdes, on voyait un foyer pigmenté disposé parfois en cercle, comme s'il limitait la périphérie d'un noyau (fig. 4 et 5).

Il ne pouvait s'agir ici d'une dégénérescence artificielle du leucocyte, telle que celle dont on vient de parler ci-dessus, car ces formes curieuses différaient entièrement des vacuoles translucides, de volume très inégal, de teinte rose clair, brillantes, dépourvues de pigment, qu'on observe dans les leucocytes morts ou en voie de dessiccation.

La meilleure preuve que cette opinion ne pouvait être admise, c'est que *ces éléments étaient animés de mouvements amiboïdes*. On les voyait, en effet, sous le microscope, se déformer, s'allonger en boyau, circuler lentement d'un pôle à l'autre du leucocyte mort, en modifiant souvent leur direction primitive (fig. 4). Parfois, le parasite arrivé à une extrémité de la cellule, faisait hernie au dehors de celle-ci : on eût dit qu'il faisait effort pour en sortir

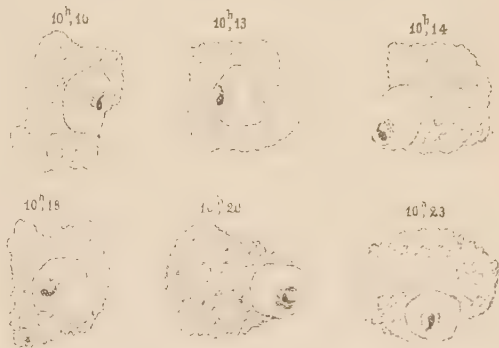


FIG. 5. — Fièvre intermittente quarte, ancienne. Sang examiné quarante-huit heures après la prise et conservé entre lame et lamelle, dans la chambre humide. [Mouvements de translation et rotation d'une amibe dans un leucocyte.

(fig. 5). Une de ces amibes introleucocytaires offrait non seulement des mouvements de translation, mais encore des mouvements de rotation (fig. 5). Dans aucun cas je n'ai observé de flagella.

Les mouvements ainsi constatés étaient semblables à ceux que peuvent présenter les amibes libres (fig. 6), dans le sang fraîchement recueilli. Ils étaient même plus actifs.

Les préparations de fièvre tierce et de fièvre quarte dans lesquelles nous avons vu le phénomène qui vient d'être décrit ont été conservées, pendant plusieurs jours, dans la chambre humide. Examinées de nouveau après 36 heures, elles n'avaient subi que



peu de modifications. Au bout de 48 heures, presque tous les hématozoaires artificiellement couvés dans les leucocytes s'étaient désagrégés et confondus avec l'amas granuleux de la cellule. Cependant il existait encore une amibe *qui avait conservé sa mobilité* dans un leucocyte entièrement déformé. Au troisième jour, les contours de ce parasite étaient devenus indistincts et il a été impossible de poursuivre plus loin l'observation <sup>1</sup>.

Il va sans dire que les mouvements lents, amiboïdes, signalés n'étaient pas causés artificiellement par la chaleur de la main ou par toute autre cause, car les globules rouges voisins, ainsi que le leucocyte lui-même, étaient complètement immobiles.

On aurait pu encore supposer que ces mouvements étaient



FIG. 6. — Fièvre intermittente quotidienne. Mouvements amiboïdes de plasmodies libres, à la température du laboratoire (19°), dans le sang extrait au début de l'accès. En B, mouvements lents du pigment contenu dans le noyau.

communiqués à l'amibe par le leucocyte lui-même, ayant continué, dans la chambre humide et sous le microscope, à exercer son action phagocytaire. Mais cette hypothèse n'était pas admis-

sible, attendu que les leucocytes de l'homme ne conservent que pendant très peu de temps leur mobilité propre en dehors des vaisseaux : 2 à 3 heures au plus après la coagulation <sup>2</sup>; encore ces mouvements n'ont-ils lieu qu'à 39°-42°, d'après Maurel <sup>3</sup>. Selon Botkine, même, les leucocytes perdent, au bout de 36 minutes, leurs mouvements spontanés <sup>4</sup>. Or mes examens ont été pratiqués à la température du laboratoire, 22, 36 et 48 heures après la prise du sang. Les leucocytes étaient donc morts depuis longtemps. Ils n'adhéraient plus, d'ailleurs, aux parois de la

1. Ce même procédé de culture entre lame et lamelle stérilisées m'a permis d'observer la transformation d'un corps en croissant en forme amiboïde, fait déjà vu par Sakharoff. On ne saurait donc, et c'est aussi l'avis de M. Laveran, admettre, avec Bignami et Bastianelli, que les corps en croissant seraient des formes de dégénérescence de l'hématozoaire, incapables de développement progressif.

2. LABADIE-LAGRAVE, *Traité des malad. du sang*, p. 27.

3. MAUREL, *Rech. expér. sur les leucocytes*, Paris, 1890-91.

4. BOTKINE, *Generatio metamorphotica quasi spontanea*. *Bolnitchnoïa Gazeta Botkina*, 1895, n° 48 et 49.

lame ou de la lamelle lorsqu'on établissait un léger courant dans la préparation.

Il s'agissait, en réalité, d'hématozoaires jeunes qui avaient été primitivement englobés par les leucocytes, dans les vaisseaux du malade, et avaient même peut-être subi un commencement de digestion. Les phagocytes étant morts, le parasite, soustrait à leur influence, s'était développé peu à peu et avait, en moins de 22 heures, atteint intégralement la phase amiboïde. Cette résurrection de l'hématozoaire rappelle le phénomène observé par M. Metchnikoff qui, en portant dans du bouillon nutritif des phagocytes chargés de bactériidies charbonneuses, a vu les bâtonnets grandir dans l'intérieur de la cellule morte.

Malgré des essais réitérés, la culture de l'hématozoaire dans le sang du malade n'a abouti qu'aux résultats dont il vient d'être parlé, et il est difficile de s'expliquer quelles raisons permettent dans certains cas, empêchent dans d'autres, le développement de l'hématozoaire dans les leucocytes morts. L'hématozoaire n'a d'ailleurs jamais dépassé le stade amibien; il n'a pas abouti, en particulier, à la forme segmentée ou sporulée.

On sait que Danilewsky a décrit, dans le sang des oiseaux, des parasites qu'il assimile entièrement à l'hémocytozoaire de l'homme. Dans le sang du hibou, il existe des formes parasitaires ayant fait, des cellules lymphatiques, leur habitat normal, pouvant s'y développer et passer au stade de *Polimitus* et de *Laverania* à gros noyau. Sans aborder ici la controverse soulevée par Danilewsky, qui admet l'identité de l'hématozoaire de l'homme et de celui des animaux, nous devons nous demander si les formes intraleucocytaires décrites dans ce travail, et dont quelques unes étaient douées de mouvements amiboïdes propres, ou présentaient une mobilité très vive de leurs grains de pigment, n'étaient autres que des *leucocytozoaires* semblables à ceux du sang des oiseaux. Cette question mérite d'autant mieux d'être soulevée, que Danilewsky admet, dans la forme prolongée de la malaria chez l'homme, la présence de ces leucocytozoaires. Mais la preuve n'en a pas été donnée entièrement et l'on peut seulement regarder cette hypothèse comme vraisemblable.

Quoi qu'il en soit, il ne paraît pas que les hématozoaires intraleucocytaires que j'ai observés chez l'homme puissent être

considérés comme des leucocytozoaires véritables. En effet, ces parasites, mobiles ou non, étaient toujours pourvus de pigment. Or, Sakharoff décrit les leucocytozoaires des oiseaux comme des sphères incolores, légèrement granulées, *sans mélanine*, de dimension plus grande que celle des hémocytes, et pourvues d'un gros noyau <sup>1</sup>. Ce ne sont pas là les caractères que j'ai constatés chez l'homme, dans les leucocytes amibifères. D'autre part, ces derniers étaient bien réellement des phagocytes actifs, car, dans un cas (fig. 4), à côté de l'amibe vivante, la même cellule renfermait un amas pigmentaire entouré d'une auréole incolore, qui représentait tout ce qui restait de la digestion d'un autre parasite englobé par la cellule dans le sang du malade.

---

1. SAKHAROFF, Rech. sur les hématoz. des oiseaux, *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1893, n° 12.



# DE L'ACTION DU SÉRUM PSEUDO-TUBERCULEUX

## SUR LE BACILLE DE LA PSEUDO-TUBERCULOSE

PAR LE D<sup>r</sup> LEDOUX-LEBARD

(Laboratoire de M. le professeur Grancher.)

---

Nous avons observé, depuis quelques mois, de nombreux cas spontanés de pseudo-tuberculose du cobaye. Cette maladie présente des formes et des localisations très variées. Le plus souvent, les cobayes qui en sont atteints s'amaigrissent comme les cobayes qui sont affectés de tuberculose de Koch, et meurent cachectiques, avec des tubercules disséminés dans les organes.

Le foie est le siège d'une éruption très abondante de tubercules miliaires, et sur la rate on voit souvent faire saillie à la surface deux ou trois gros tubercules, du volume d'un petit grain de chenevis ou d'un pois, remplis de pus caséeux. Cet aspect des tubercules de la rate, très différent de ce que l'on observe dans la tuberculose de Koch, la saillie plus forte, la couleur plus blanche des tubercules du foie, l'existence, sur cet organe, de un ou deux tubercules plus volumineux que tous les autres, font souvent soupçonner la nature de cette tuberculose, que nous avons proposé, dans un travail fait en collaboration avec M. le Professeur Grancher, de dénommer tuberculose de Malassez, pour la distinguer de la tuberculose de Koch et des autres tuberculoses<sup>1</sup>.

L'ensemencement sur gélose des organes et du sang tranche cette question de diagnostic en 24 heures. En cas de pseudo-tuberculose, la surface de la gélose se couvre, au bout de ce

1. GRANCHER ET LEDOUX-LEBARD. Recherches sur la tuberculose zooglétique. *Arch. de méd. exp.* 1<sup>er</sup> mars 1889. N° 2. — La tuberculose zooglétique (2<sup>e</sup> mémoire). *Arch. de méd. exp.* 1<sup>er</sup> septembre 1890. N° 5. — Infection pseudo-tuberculeuse par les voies digestives, par LEDOUX-LEBARD. — *Arch. de méd. exp.* 1891, n° 2.

temps, de colonies nombreuses formées d'un bacille ovoïde, mobile, facilement colorable dans les solutions aqueuses de colorants d'aniline, ne gardant pas le Gram, et dont l'inoculation au cobaye amène la mort plus rapidement que ne le fait le bacille de Koch.

Ces caractères suffisent pour reconnaître la pseudo-tuberculose et offrent plus de garantie que l'étude des lésions au moyen des coupes et la coloration souvent très difficile des colonies en zoogléas ou sous forme diffuse, qui pullulent dans les organes.

La pseudo-tuberculose du lapin est beaucoup plus rare. Nous ne l'avons observée qu'une seule fois, cette année, alors que les cas, chez le cobaye, étaient très nombreux. De plus, le lapin résiste longtemps ou même guérit à la suite d'inoculation, sous la peau, de petites doses de cultures. Nous avons fait choix de cet animal pour étudier l'action du sérum pseudo-tuberculeux sur les cultures du bacille de la pseudo-tuberculose.

#### I. — PROPRIÉTÉS AGGLUTINANTES DU SÉRUM DU LAPIN PSEUDO-TUBERCULEUX.

En examinant au microscope une goutte du mélange obtenu en diluant une partie de sérum du sang d'un lapin pseudo-tuberculeux, dans neuf parties de bouillon de culture de pseudo-tuberculose, on constate facilement le phénomène de l'agglutination. Au bout de 15 à 20 minutes, les bacilles jusque-là disséminés dans le liquide se rassemblent par petits groupes irréguliers. Ces amas naissants, soit qu'ils se réunissent à d'autres semblables, soit que de nouveaux bacilles viennent s'y accoler, grossissent de plus en plus. En même temps, les espaces qui les séparent s'appauvrissent en microbes. Ceux qu'on y voit encore nagent d'un mouvement moins rapide, et ne tardent pas à être agglutinés, à leur tour, à la surface des amas déjà formés. Bientôt, on ne voit plus, dans la préparation, que des amas irréguliers de bacilles, séparés par des espaces clairs dans lesquels on trouve difficilement quelques microbes non agglutinés et ayant perdu plus ou moins complètement leur mobilité.

On retrouve donc, pour la pseudo-tuberculose, la réaction agglutinante, telle qu'on l'observe dans la fièvre typhoïde, et

caractérisée essentiellement : 1<sup>o</sup> par l'agglomération ; 2<sup>o</sup> par la diminution ou la perte de mobilité des bacilles.

Pour observer les phénomènes, le procédé qui nous a paru le meilleur est celui de la goutte pendante placée sur lamelle reposant sur une lame creuse. Nous obtenions facilement du sérum en extrayant quelques centimètres cubes de sang de l'oreille d'un lapin pseudo-tuberculeux, à l'aide d'une seringue stérilisée. Un tube de bouillon ensemencé depuis 24 heures et maintenu à la température de la chambre est suffisamment riche en microbes pour l'étude de la réaction. Les microbes y sont mobiles, disséminés, sans amas notable. Pour préparer des dilutions de titre connu, nous nous sommes servi de pipettes graduées, ou bien nous avons suivi le procédé très simple indiqué par MM. Widal et Sicard <sup>1</sup>, et qui consiste à étirer des tubes de verre par leur milieu et à briser le milieu de l'effilure, afin d'obtenir deux pipettes jumelles, de calibre sensiblement égal, qu'on peut utiliser comme compte-gouttes pour le bouillon et le sérum.

L'addition directe d'une quantité suffisante de sérum dans un tube de bouillon de culture de pseudo-tuberculose est suivie, en 12 ou 24 heures, d'une clarification du liquide. Le développement de la culture est non pas arrêté, mais modifié par la présence du sérum, comme on en juge facilement par comparaison avec un tube de bouillon de culture de même âge et sans sérum. Ce dernier se trouble uniformément, alors que, dans le premier, la culture ne paraît se développer que dans les couches inférieures du liquide, ou du moins s'y dépose rapidement au lieu de rester en suspension dans le liquide. Mais la formation de grumeaux, d'amas microbiens visibles, n'est pas très nette, et, en définitive, ce procédé macroscopique pour rechercher la réaction agglutinante, dans la pseudo-tuberculose, n'a pas la sûreté du précédent.

Nous avons plusieurs fois comparé l'action du sérum de lapin neuf à celle du sérum de lapin pseudo-tuberculeux, sur les mêmes cultures, en faisant des dilutions au même titre et en nous servant du même procédé d'examen. Ou bien le sérum normal ne modifie pas l'aspect de la culture : les bacilles restent dissé-

1. Etude sur le séro-diagnostic et sur la réaction agglutinante chez les typhiques. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1897. N<sup>o</sup> 5, p. 399.

minés également dans toutes les parties de la goutte de liquide examinée et ils conservent leur mobilité ; ou bien il se produit des agglomérations de bacilles. Dans le dernier cas, le phénomène se distingue de ce qu'il est avec le sérum pseudo-tuberculeux : 1° Il exige pour se produire une dilution de titre élevé, et cesse de se manifester dans les dilutions étendues, alors que dans les dilutions de titre égal, faites avec le sérum pseudo-tuberculeux, la réaction persiste ; 2° l'agglutination est incomplète, et dans les intervalles des amas, le liquide, au lieu de se clarifier, contient encore de nombreux microbes conservant une grande mobilité. Le pouvoir agglutinant du sérum normal est donc incomparablement moins actif que celui du sérum pseudo-tuberculeux.

Le pouvoir agglutinant du sérum d'un lapin inoculé sous la peau, depuis 64 jours, avec une culture de pseudo-tuberculose était comprise entre 100 et 1000, après une heure de contact. La dilution à 1 pour 10 donnait des amas en 15 minutes ; la dilution à 1 pour 100, en 1 heure ; la dilution à 1 pour 1000 ne présentait pas d'amas au bout de 12 heures.

Nous n'avons pas constaté le phénomène de l'agglomération, dans un cas où nous avons expérimenté avec le sang du cobaye pseudo-tuberculeux, au lieu de nous servir du sang du lapin affecté de la même maladie, comme dans les expériences précédentes ; dans un autre cas, le sang d'un cobaye pseudo-tuberculeux depuis sept jours produisait nettement l'agglutination dans la dilution au centième.

## II. — DU DÉVELOPPEMENT EN FILAMENTS ET DE LA DISPOSITION EN RÉSEAUX, SOUS L'INFLUENCE DU SÉRUM PSEUDO-TUBERCULEUX.

Le sérum du lapin pseudo-tuberculeux, s'il provoque l'agglutination des bacilles, n'arrête pas la poussée de la culture. Mais on peut supposer, *a priori*, qu'il en modifiera le développement. Dans l'évolution normale, les bacilles jeunes se détachent des bacilles générateurs et se répandent dans le milieu de culture. L'action agglutinante doit s'opposer à cette mise en liberté des bacilles nouvellement formés, et, si cette action est capable de s'exercer au début même du travail de segmentation, ce que l'expérience seule peut apprendre, cette segmentation restera



incomplète et les bacilles se développeront en filaments. Si l'on veut suivre le développement des bacilles dans le mélange de sérum et de bouillon, il faut éliminer autant que possible la formation des amas microbiens. Il faut que les bacilles observés, bien que soumis à l'action agglutinante, restent isolés ou, du moins, ne soient pas masqués par l'entassement de microbes agglutinés. Pour cela, nous faisons une dilution très étendue de ces bacilles, en ensemençant, avec une anse de platine chargée de bouillon de culture de 12-24 heures, un tube de bouillon neuf. Ce bouillon, qui vient d'être ensemencé, est mélangé au sérum que l'on veut essayer dans la proportion qui, pour le bouillon de culture non dilué et le sérum, donne la réaction agglutinante bien nette, et le mélange sert à préparer des gouttes pendantes, au moyen de lames et lamelles soigneusement passées à la flamme. En lutant à la paraffine les bords de la lamelle, les gouttes se conservent assez longtemps pour permettre de suivre, pendant plusieurs jours, le développement des microbes à la température de la chambre. On peut omettre de luter la lamelle, et la faire reposer simplement, par ses bords, sur le porte-objet creux, à la condition de placer la préparation dans la chambre humide.

Dans ces gouttes maintenues à la température de la chambre, on ne tarde pas à voir, au bout de 6 à 12 heures, des bacilles remarquables par leur dimension en longueur. Ils restent isolés, ou bien, s'il y a d'autres bacilles à proximité, ils se soudent à eux en formant des petits amas. L'agglutination se fait parfois avec assez de lenteur pour qu'on puisse en suivre les diverses phases. Le bacille le plus mobile se meut auprès de l'autre en lui présentant une de ses extrémités ; il s'en rapproche, le touche, s'en éloigne et après avoir répété un certain nombre de fois ces évolutions, y reste définitivement soudé par une de ses extrémités, tandis que l'autre extrémité oscille autour du point d'attache d'un mouvement irrégulier. Il résulte de ce mode d'agglutination que, dans ces amas naissants, les bacilles ne sont pas disposés parallèlement et pour ainsi dire côte à côte, mais forment, par leur réunion, des angles plus ou moins ouverts, en sorte que l'amas est lâche et ajouré de vides séparant les bacilles qui le constituent.

Isolés ou ainsi réunis en faibles amas, ces bacilles ne tardent

pas à s'allonger démesurément, en sorte que le nom de bacilles ne leur est plus applicable. Ce sont de véritables filaments dans lesquels les lignes de segmentation sont souvent tardives. Cependant, tôt ou tard, elles apparaissent, indiquant par leurs traces les extrémités des bacilles qu'elles séparent, et, suivant que ces lignes de segmentation sont plus ou moins rapprochées, les filaments se trouvent constitués de bacilles longs ou courts, de bâtonnets ou de grains ovoïdes (fig. 4 à 6, PL. XXII).

De même que nous avons vu les bacilles se souder, sans s'accoler par leurs bords ni se presser les uns contre les autres, de même les filaments, en s'allongeant, se soudent entre eux, à leurs points de croisement, et forment un réseau à mailles irrégulières, limitées par des chaînes de bacilles (fig. 6).

Vue alors à un faible grossissement, la goutte de culture présente, çà et là, de ces amas réticulés séparés des amas voisins par des espaces clairs où nagent, en petit nombre, des bacilles ou des filaments restés libres, immobiles ou animés de faibles mouvements.

Plus fortement grossis, les amas rappellent, par leur aspect, des filets de pêcheur étalés sur le sol; au centre, il est difficile de distinguer les mailles du filet, à cause de la masse de fils entassés; à la périphérie, elles deviennent de plus en plus distinctes. Il en est de même pour les réseaux microbiens avec leurs mailles polygonales limitées par des chapelets de bacilles ou de cocci.

Ce n'est que par l'examen de cultures en gouttes pendantes que nous avons pu observer les réseaux. Il est difficile de les colorer. Les mouvements imprimés à la préparation altèrent la disposition des filaments ou les tassent en amas opaques. D'autre part, la dessiccation et le passage de la lamelle dans la flamme fixent les microbes; mais la goutte de bouillon et de sérum, en se desséchant, forme un dépôt de matière organique nuisible à la coloration. C'est néanmoins en suivant ce dernier procédé, après avoir absorbé partiellement la goutte de liquide avec du papier buvard et en colorant au brun d'aniline, que nous avons obtenu des préparations passables en quelques endroits et qu'il nous a été possible de photographier. Ces préparations, après avoir été colorées dans la solution aqueuse saturée de brun d'aniline, étaient lavées à l'eau et montées dans

le mélange à parties égales de solution de brun d'aniline et de glycérine, selon la méthode indiquée par Koch.

Le phénomène du développement en filaments et de la disposition en réseaux est bien particulier au sérum de lapin pseudo-tuberculeux; nous n'avons pu l'obtenir avec le sérum neuf. Il exige, pour se produire, une proportion de sérum égale à celle qui donne la réaction agglutinante bien franche dans le bouillon de culture non dilué. Ces faits n'autorisent pas encore à affirmer que le phénomène soit dû à la même substance qui donne au sérum sa propriété agglutinante, bien que cette propriété suffise, comme nous l'avons vu, à donner une explication de ce développement anormal et qu'elle nous ait conduit à en rechercher l'existence.

#### EXPLICATION DE LA PLANCHE XXII

I. Colonie de bacilles de la pseudo-tuberculose, développée à la température ordinaire, en 12 heures, dans le mélange : sérum de lapin pseudo-tuberculeux, 1 partie pour 9 de bouillon de culture.

$$\text{Gr}^t = \frac{1000}{1}$$

II. Une colonie des mêmes bacilles, développée dans le même mélange et au bout de 24 heures, à la température ordinaire. Chaînes de bacilles ovoïdes.

$$\text{Gr}^t = \frac{1000}{1}$$

III. Formation réticulaire, dans un mélange au 10<sup>e</sup> de sérum de lapin pseudo-tuberculeux et de bouillon de culture de pseudo-tuberculose.

$$\text{Gr}^t = \frac{1000}{1}$$

IV et V. Formations réticulaires dans un mélange de sérum pseudo-tuberculeux et de bouillon de culture à 1 pour 10, après 30 heures à la température ordinaire.

$$\text{Gr}^t = \frac{1000}{1}$$

VI. Même préparation. Vue d'ensemble.

$$\text{Gr}^t = \frac{350}{1}$$





## TABLE DES MATIÈRES

---

Recherches physiologiques sur une moisissure nouvelle, l' <i>Eurotiosis Gayoni</i> , par M. J. LABORDE. . . . .	4
Fixation de l'azote libre par le bacille des nodosités des légumineuses, par M. MAZÉ. . . . .	44
Contribution à l'étude du bacille typhique, par MM. REM-LINGER et SCHNEIDER. . . . .	55
Les angines à bacille de Friedlænder, par MM. CH. NICOLLE et HÉBERT. . . . .	67
Note sur un bacille de Friedlænder isolé de la vase de la Seine, par MM. CH. NICOLLE et HÉBERT. . . . .	80
Sur la peste bubonique, par M. le Dr YERSIN. . . . .	81
Lettre de M. le Dr DE CHRISTMAS sur le jéquirité. . . . .	94
Lésion du myocarde dans l'intoxication aiguë par la toxine diphtérique, par MM. J. MOLLARD et CL. REGAUD. . . . .	97
La séborrhée grasse et la pelade, par M. SABOURAUD. . . . .	134
Action antitoxique de l'hyposulfite de soude vis-à-vis des dinitriles normaux, par MM. J. F. HEYMANS et P. MASOIN. . . . .	161
Contribution à l'étude du sérum antistreptococcique, par M. J. BORDET. . . . .	177
Sur le venin des serpents et l'emploi du sérum antivenimeux dans la thérapeutique, par M. le Dr A. CALMETTE. . . . .	214
Réponse à M. METCHNIKOFF, par M. le Dr G. GABRITCHEVSKY. . . . .	238
Réponse à la note précédente, par M. E. METCHNIKOFF. . . . .	245
Contribution à l'étude de la physiologie du bacille diphtérique, par M. L. COBBETT. . . . .	251
Contribution à l'étude de l' <i>Amylomyces Rouxii</i> , de la levure chinoise, et des moisissures ferments de l'amidon, par M. J. SANGUINETI. . . . .	264

Recherches sur l'immunité dans le choléra. Premier mémoire : sur l'agglutination, par M. le Dr SALIMBENI.	277
Fermentation alcoolique sans globules de levure par M. E. BUCHNER . . . . .	287
Statistique de l'Institut Pasteur, octobre, novembre et décembre 1896. . . . .	288
Recherches sur l'infection dans la vaccine et la variole, par M. P. SALMON. . . . .	289
Sur la phagolyse dans la cavité péritonéale, par M. le Dr G. PIERALLINI. . . . .	308
Recherches sur la marche de l'immunisation active contre la diphtérie, par MM. C. SALOMONSEN et T. MADSEN. . .	315
Méthode de coloration à la fois simple et contrastante des microbes, par M. le Dr CLAUDIUS . . . . .	332
Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1896, par M. H. POTTEVIN. . . . .	336
Études critiques et recherches expérimentales sur les microbes de la septicémie hémorragique et sur les maladies qu'ils produisent, par M. A. VOGES . . . . .	342
La fermentation fractionnée du sucre de canne avec des levures pures, par M. HIEPE . . . . .	348
Étude sur le sérodiagnostic et sur la réaction agglutinante chez les typhiques, par MM. F. WIDAL et SICARD. . . .	353
Étiologie et pathogénie de la fièvre jaune, par M. le Dr SANARELLI. . . . .	433
Extrait d'un mémoire intitulé : <i>Recherches expérimentales et anatomiques sur la fièvre jaune</i> , par M. le Dr HAVELBURG.	545
Sur une nouvelle septicémie des veaux, avec néphrite et urocystite consécutives, par M. THOMASSEN. . . . .	523
Sur la richesse du lait en éléments minéraux et phosphates terreux, par M. L. VAUDIN. . . . .	544
L'évolution des sporozoaires du genre <i>Coccidium</i> , par M. le Dr P. SIMOND, . . . . .	545
Recherches sur l'agglutination du <i>bacillus typhosus</i> par des substances chimiques, par M. le Dr E. MALVOZ . . . . .	582
Recherches sur la toxine tétanique, par M. le Dr A. MARIE.	591
Combustion biologique du propylglycol, par M. A. PÉRÉ.	600
Contribution à l'étude du gonocoque et de sa toxine, par M. le Dr J. DE CHRISTMAS. . . . .	609
Le paludisme au Sénégal, par M. le Dr MARCHOUX. . . . .	640

Recherches sur la peste bubonique, par MM. WYSSOKOWICZ et ZABOLOTNY . . . . .	663
Un mot sur l'histoire du séro-diagnostic, par M. GRÜNBAUM.	670
A propos de la note ci-dessus de M. Grünbaum, par M. WIDAL. . . . .	671
Étiologie et pathogénie de la fièvre jaune, par M. le Dr J. SANARELLI, second mémoire. . . . .	673
Les bases physiques du traitement antiparasitaire des plaies, par M. le Dr PRÉOBAJENSKY. . . . .	699
Action des levures de bière sur le lait, par M. BOULLANGER.	720
L'état actuel de la question de la leucocytose, <i>revue critique</i> . . .	726
La peste bubonique, <i>revue critique</i> . . . . .	737
L'immunité et la sérothérapie contre la fièvre jaune, par M. le Dr SANARELLI, troisième mémoire . . . . .	733
Recherches sur la destruction des microbes dans la cavité péritonéale des cobayes immunisés, par M. M. GARNIER.	767
Recherches sur le bouton d'Alep, par MM. NICOLLE et NOURY- BEY . . . . .	777
Note sur un bacille pathogène pour l'ulcère de l'YEMEN, par M. M. CRENDIROPOULO . . . . .	784
Statistique de la station Pasteur de Tiflis, par M. le Dr FRANTZIUS. . . . .	790
Sur l'action des diastases, <i>revue critique</i> . . . . .	793
Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines, par M. E. METCHNIKOFF . . . . .	801
Recherches sur les propriétés toxiques et antitoxiques du sang et de la bile des anguilles et des vipères, par M. le Dr WEHRMANN . . . . .	810
Fièvre typhoïde expérimentale par contamination alimen- taire, par M. Dr P. REMLINGER . . . . .	829
Contribution à l'étude de l'alcoolisme expérimental, et de son influence sur l'immunité, par M. le Dr DELÉARDE. .	837
Recherches bactériologiques sur le rhumatisme articulaire aigu, premier mémoire, par M. le Dr P. ACHALME. . . .	843
Gangrène gazeuse subaiguë provoquée par un bacille spé- cial, par M. CHAVIGNY . . . . .	860
Contribution à l'étude de l'immunité, par M. le professeur SAWTCHENKO. . . . .	865

Contribution à l'étude du processus leucocytaire dans la malaria, par M. le D <sup>r</sup> VINCENT. . . . .	891
De l'action du sérum pseudo-tuberculeux sur le bacille de la pseudo-tuberculose, par M. le D <sup>r</sup> LEDOUX-LEBARD . .	909
Table des matières. . . . .	917

---



# TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

## TRAVAUX ORIGINAUX

ACHALME . . . . .	Recherches bactériologiques sur le rhumatisme articulaire aigu . . . . .	845
BORDET . . . . .	Sérum antistreptococcique . . . . .	177
BOULLANGER . . . . .	Action des levures de bière sur le lait . . . . .	720
CALMETTE (A). . . . .	Venin et sérum antivenimeux . . . . .	214
CHAVIGNY . . . . .	Gangrène gazeuse subaiguë . . . . .	860
CHRISTMAS (DE) . . . . .	Lettre au sujet du jéquirity . . . . .	94
— . . . . .	Le gonocoque et sa toxine . . . . .	609
CLAUDIUS . . . . .	Méthode de coloration . . . . .	332
COBBETT . . . . .	Physiologie du bacille diphtérique . . . . .	251
CRENDIVOPOULO . . . . .	Ulcère de l'Yémen . . . . .	784
DELÉARDE . . . . .	Étude de l'alcoolisme expérimental . . . . .	837
FRANTZIUS . . . . .	Statistique de la station Pasteur de Tiflis . . . . .	790
GABRITCHESKI . . . . .	Réponse à M. Metchnikoff . . . . .	238
GARNIER . . . . .	Destruction des microbes dans la cavité péritonéale . . . . .	767
GRUNBAUM . . . . .	Un mot sur l'histoire du sérodiagnostic . . . . .	670
HAVELBURG . . . . .	Recherches expérimentales sur la fièvre jaune . . . . .	515
HEBERT . . . . .	Voir NICOLE.	
HEYMANS et MASOIN . . . . .	Hyposulfite de soude et dinitriles normaux . . . . .	161
LABORDE . . . . .	<i>L'Eurotiopsis Gayoni</i> . . . . .	4
LEDoux-LEBARD . . . . .	Bacille de la pseudo-tuberculose . . . . .	909
MADSEN . . . . .	Voir SALOMONSEN.	
MALVOZ . . . . .	Agglutination par des substances chimiques . . . . .	582
MARCHOUX . . . . .	Le Paludisme au Sénégal . . . . .	640
MARIE . . . . .	Recherches sur la toxine tétanique . . . . .	591
MASOIN . . . . .	Voir HEYMANS.	
MAZÉ . . . . .	Fixation de l'azote dans les légumineuses . . . . .	44
METCHNIKOFF . . . . .	Réponse à M. Gabritchewski . . . . .	245
— . . . . .	Influence de l'organisme sur les toxines . . . . .	801
MOLLARD et REGAUD . . . . .	Myocarde dans l'intoxication diphtérique . . . . .	97
NICOLLE et HEBERT . . . . .	Les angines à bacille de Friedländer . . . . .	67
— . . . . .	Bacille isolé de la vase de la Seine . . . . .	80

NICOLE et NOURY-BEY . . .	Recherches sur le bouton d'Alep . . . . .	777
PÉRÉ. . . . .	Combustion biologique du propylglycol . .	600
PIERALLINI . . . . .	Phagolyse dans la cavité péritonéale. . .	308
POTTEVIN. . . . .	Les vaccinations en 1896 à l'Institut Pasteur	336
PREOBAJENSKY . . . . .	Traitement antiparasitaire des plaies . .	699
REGAUD. . . . .	Voir MOLLARD.	
REMLINGER et SCHNEIDER. .	Étude du bacille typhique . . . . .	55
— . . . . .	Fièvre typhoïde expérimentale. . . . .	829
SABOURAUD. . . . .	La Séborrhée grasse et la pelade . . . .	434
SALIMBENI. . . . .	Sur l'agglutination . . . . .	277
SALMON. . . . .	Infection dans la vaccine et la variole. .	289
SALOMONSEN et MADSEN . .	Immunisation active dans la diphtérie . .	315
SANARELLI. . . . .	Etiologie et pathogénie de la fièvre jaune.	433
— . . . . .	Etiologie et pathologie de la fièvre jaune, 2 <sup>e</sup> mémoire . . . . .	673
— . . . . .	L'immunité et la sérothérapie de la fièvre jaune. . . . .	753
SANGUINETI . . . . .	Comparaison de divers ferments de l'amidon	264
SAWTCHENKO . . . . .	Etude sur l'immunité . . . . .	865
SCHNEIDER. . . . .	Voir REMLINGER.	
SIGARD. . . . .	Voir WIDAL.	
SIMOND . . . . .	Évolution des sporozoaires du genre <i>coccidium</i>	545
THOMASSEN . . . . .	Nouvelle septicémie des veaux. . . . .	523
VAUDIN. . . . .	Éléments minéraux et phosphates du lait. .	541
VINGENT. . . . .	Leucocytes dans la malaria . . . . .	891
WEHRMANN . . . . .	Sang et bile des anguilles et des vipères . .	810
WIDAL et SIGARD . . . . .	Sérodiagnostic et réaction agglutinante . .	353
— . . . . .	Réponse à M. Grunbaum . . . . .	671
WYSOKOWICZ. . . . .	Sur la peste bubonique . . . . .	663
YERSIN. . . . .	Sur la peste bubonique . . . . .	81
ZABOLOTNY. . . . .	Voir WYSOKOWICZ.	

## REVUES ET ANALYSES

BUCHNER (E.). . . . .	Fermentation alcoolique sans levure . . . .	287
HIEPE. . . . .	Fermentation fractionnée du sucre de cannes	348
VOGES. . . . .	Microbes de la septicémie hémorragique. .	342

## REVUES CRITIQUES

BESREDKA. . . . .	L'état actuel de la question de la leucocytose	726
METCHNIKOFF . . . . .	La peste bubonique. . . . .	737
DUCLAUX . . . . .	Sur l'action des diastases . . . . .	793

## PLANCHES HORS TEXTE

Planches I et II. . . . .	Mémoire de MM. MOLLARD et REGAUD. . .	97
III et IV. . . . .	— M. SABOURAUD . . . . .	134
V. . . . .	— M. BORDET. . . . .	177
VI. . . . .	— M. SALMON . . . . .	289
VII à XV . . . . .	— M. SANARELLI. . . . .	433
XVI et XVII. . . . .	— M. SIMOND. . . . .	545
XVIII. . . . .	— M. MARCHOUX . . . . .	640
XVIII <i>bis</i> à XX . . . . .	— M. SANARELLI . . . . .	673
XXI. . . . .	— M. GARNIER . . . . .	767
XXII. . . . .	— M. LEDOUX-LEBARD . . . . .	909

---

*Le Gérant : G. MASSON.*

---

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.















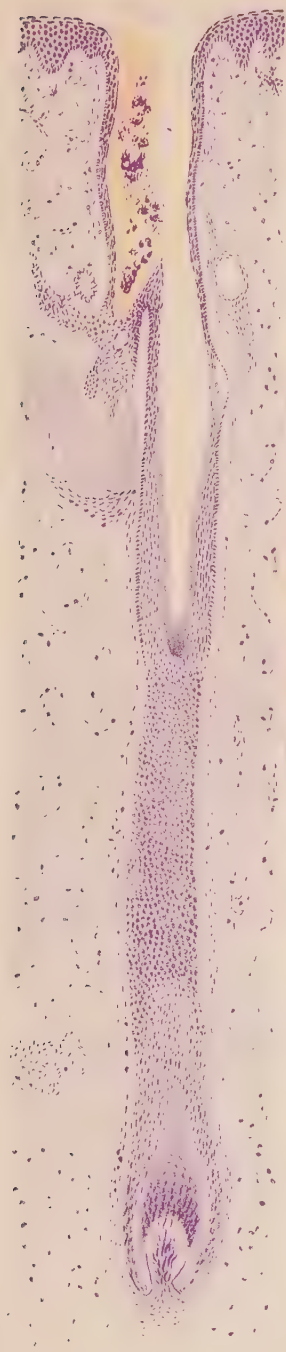


Fig. 1.

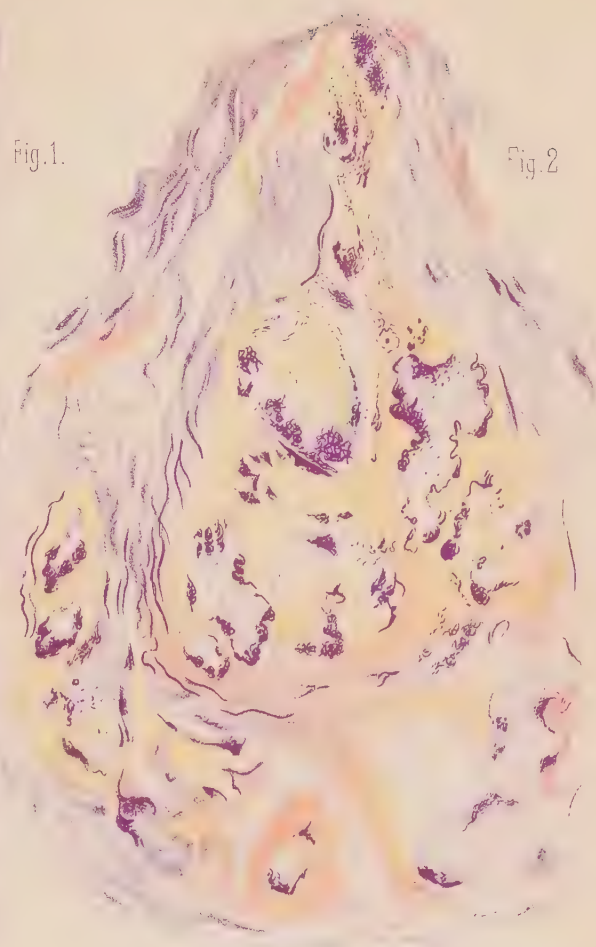


Fig. 2.

Fig 3

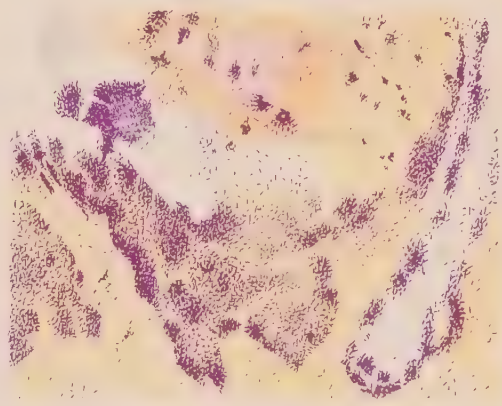
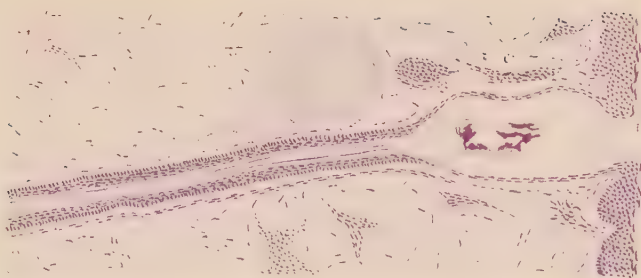


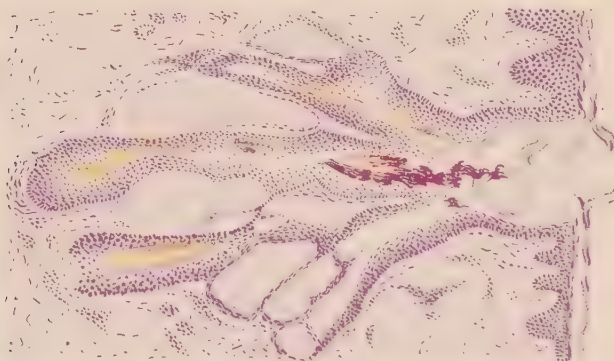


Fig 1



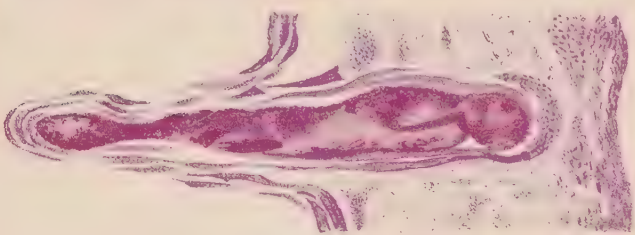
*Amoeba*

Fig 6



*Amoeba*

Fig 3



*Amoeba*

Fig. 2.

*Amoeba*

Fig 4

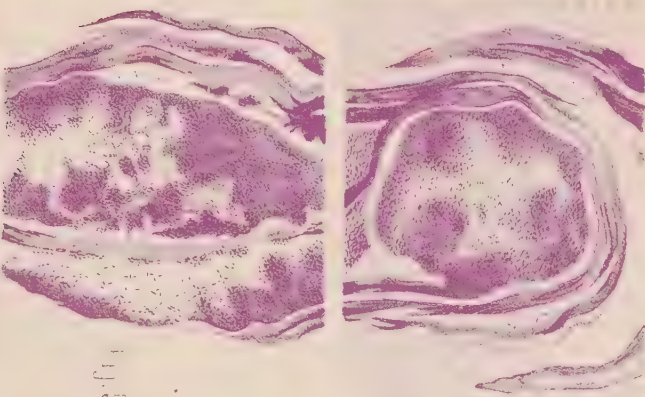
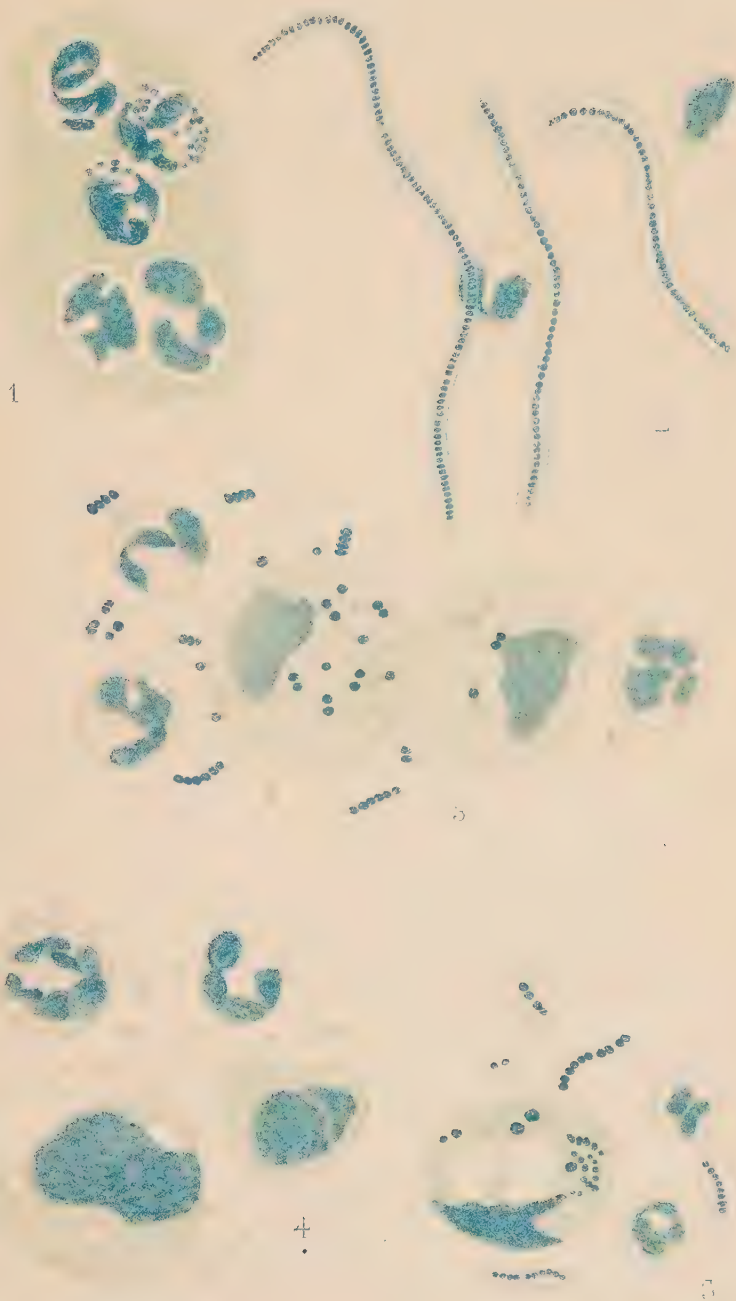


Fig. 5

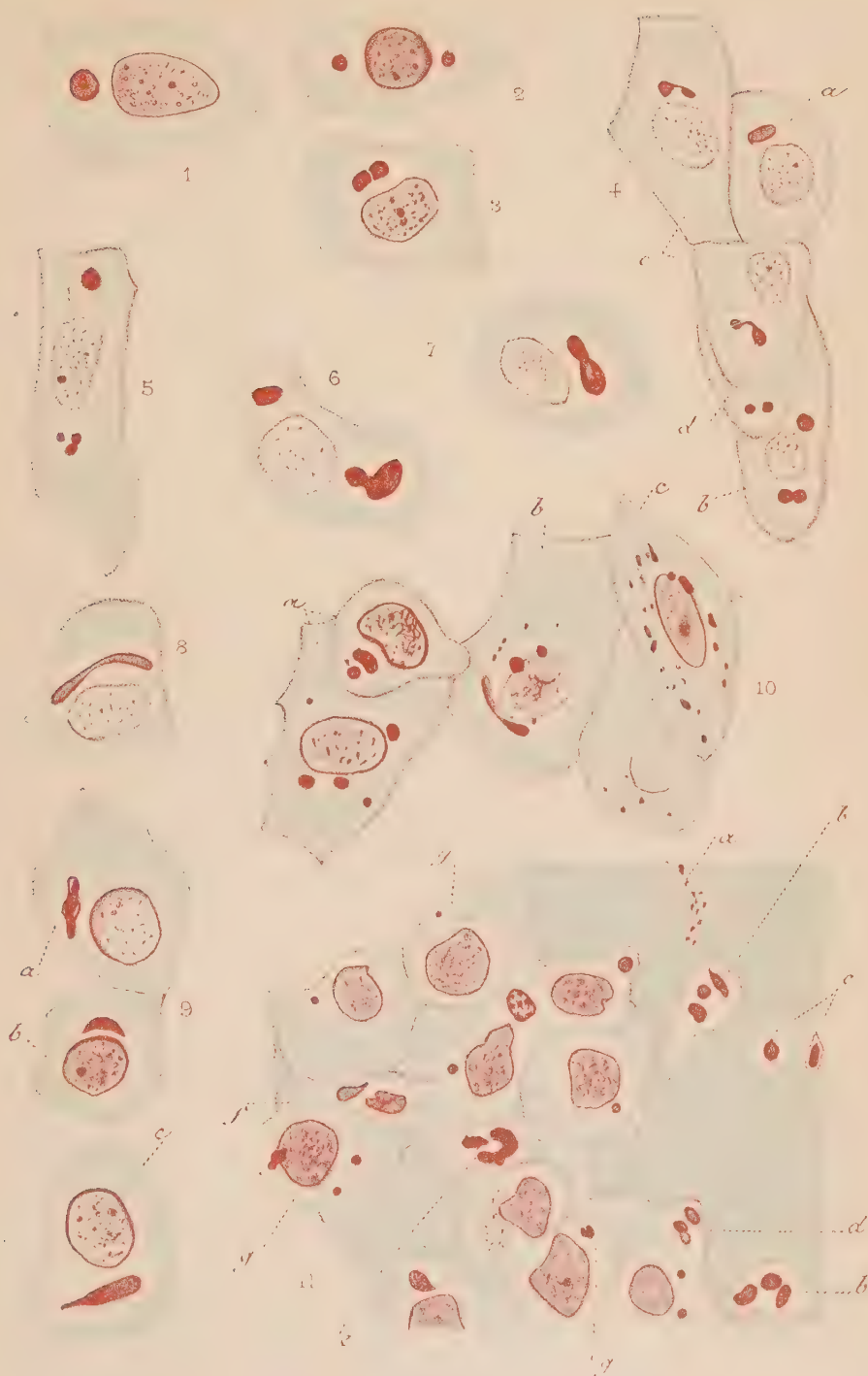
*Amoeba*









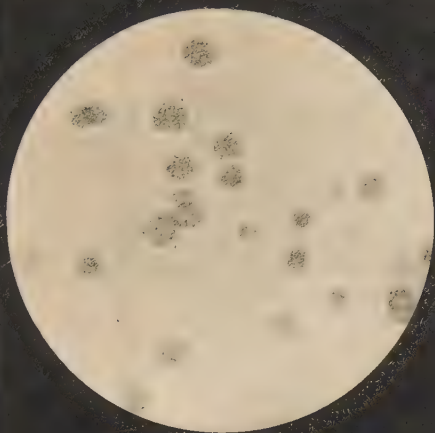


Salmon del.

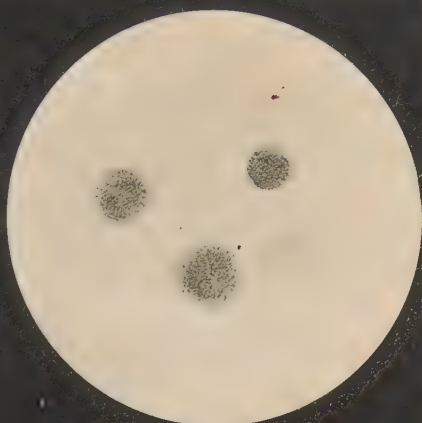
V. Roussel lith.



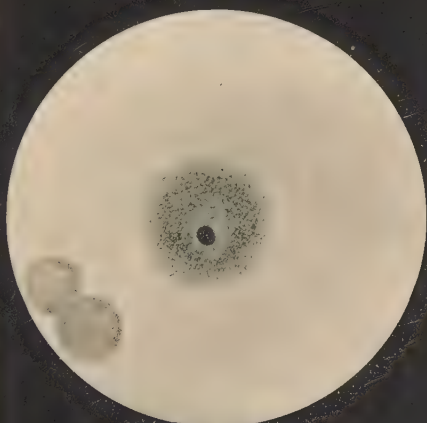




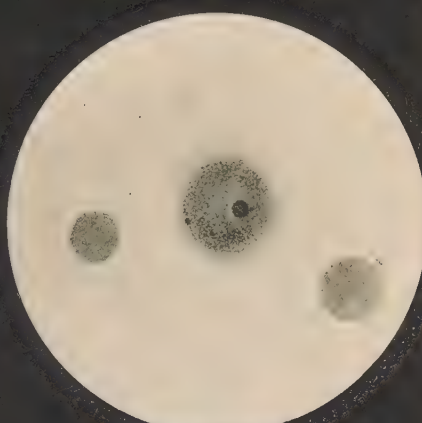
1.



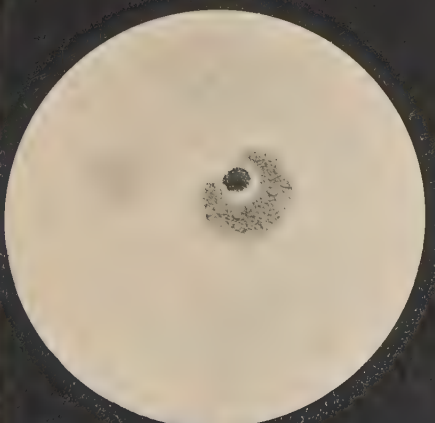
2.



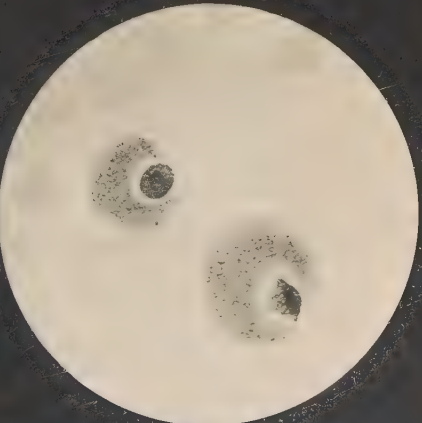
3.



4.

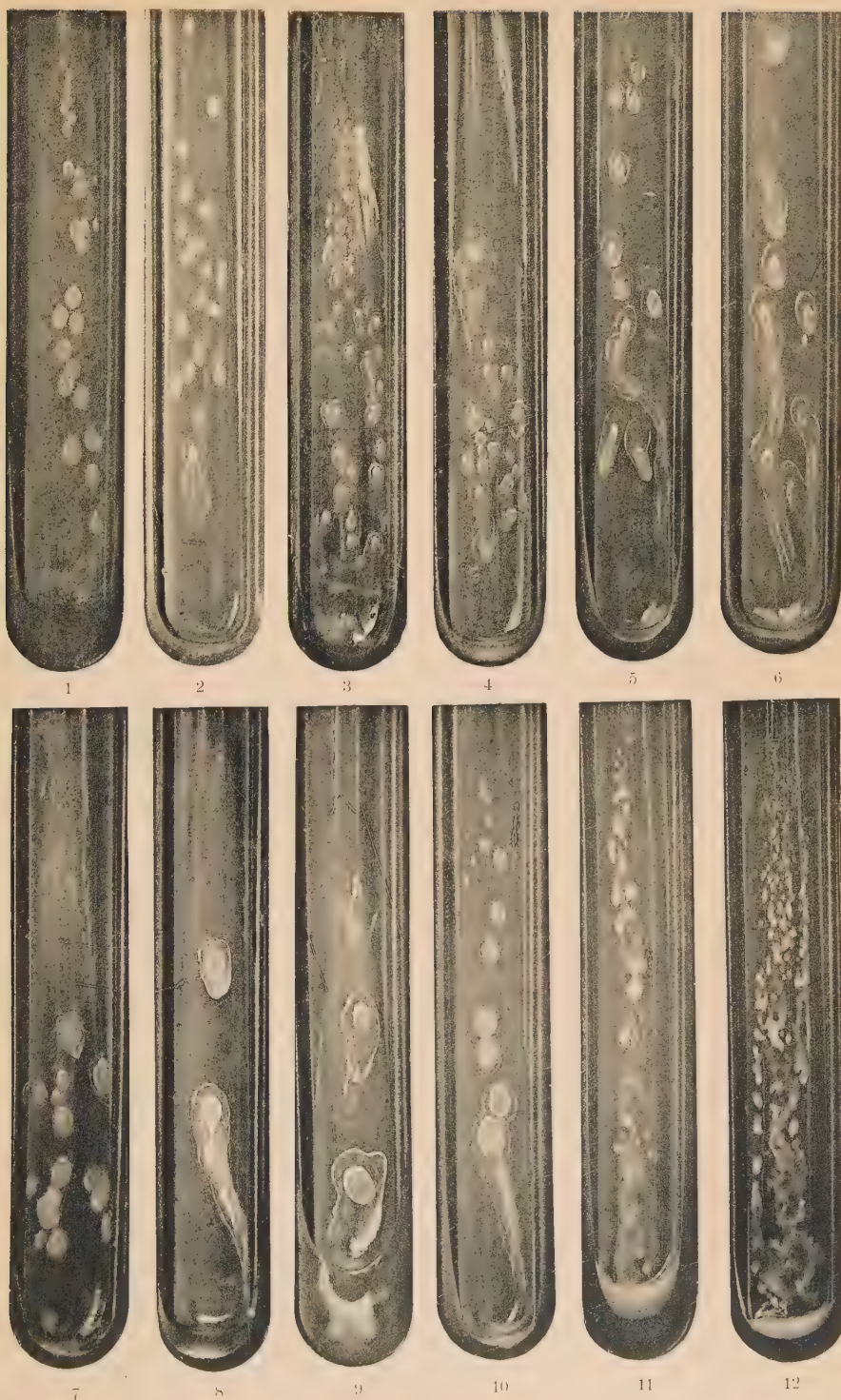


5.



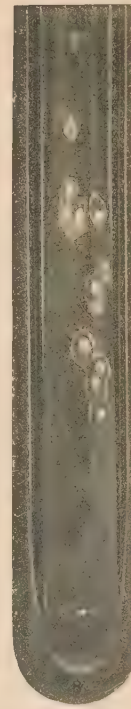
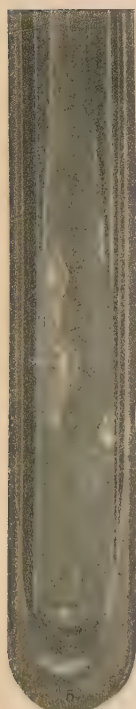
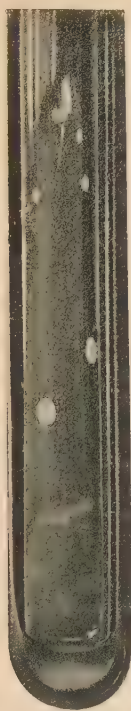
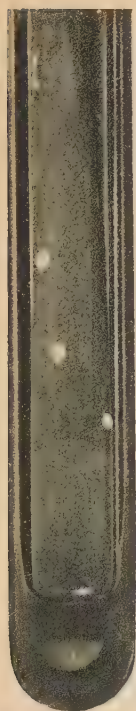
6.





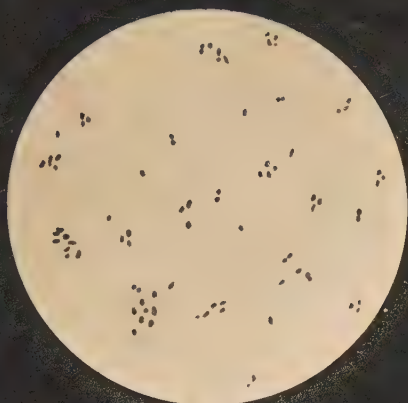




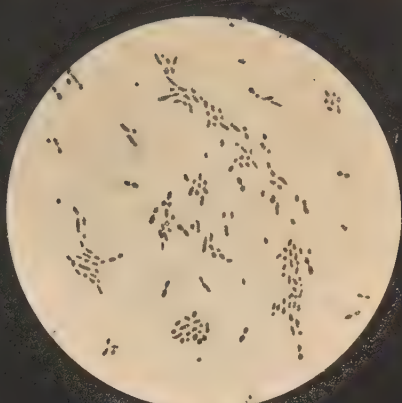




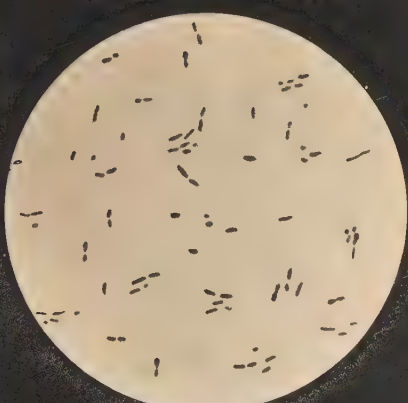




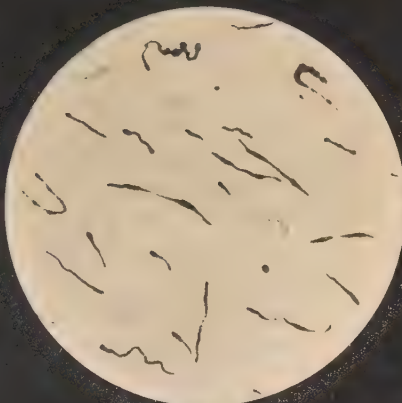
1.



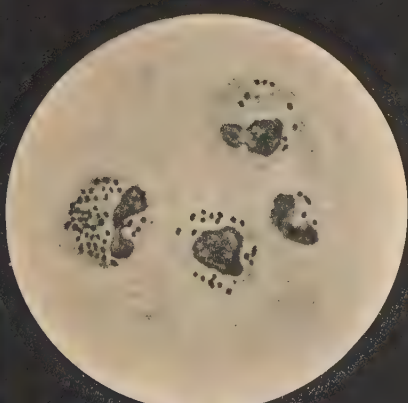
2.



3.



4.



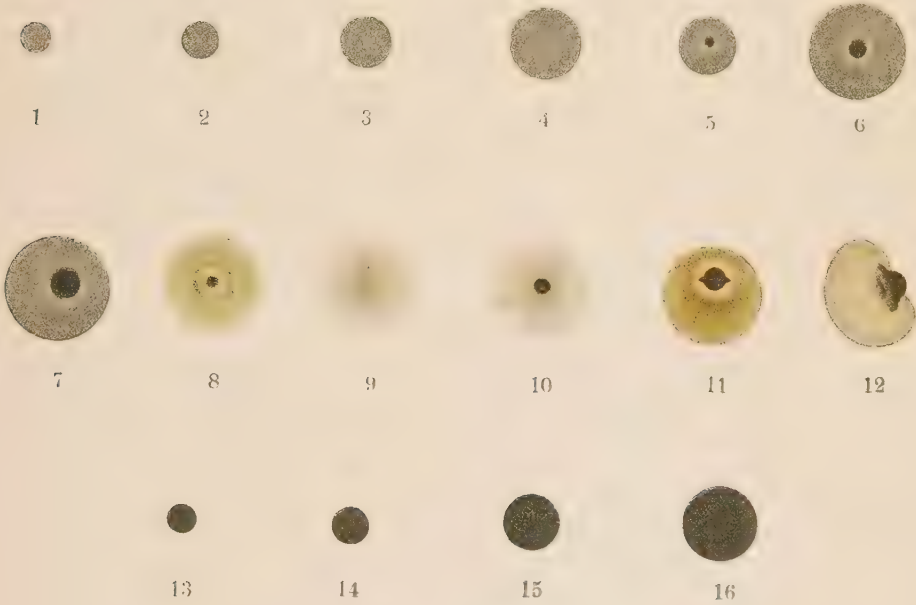
5.



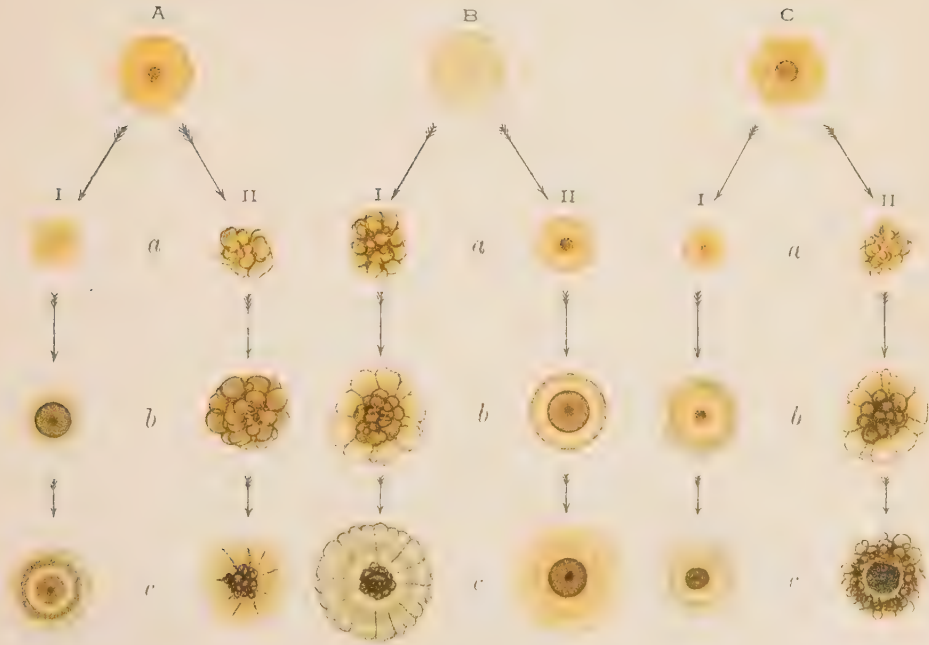
6.



BACILLUS ICTEROÏDES

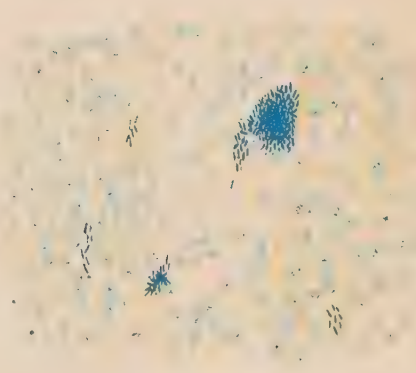
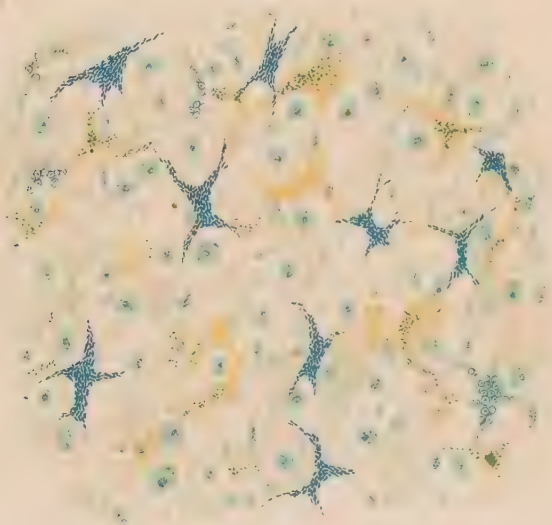
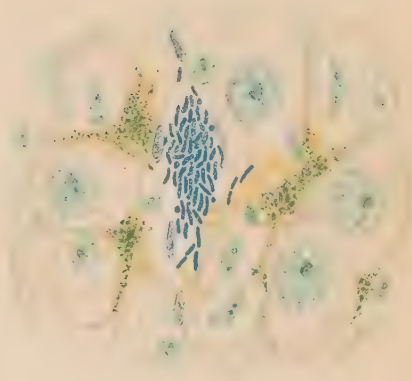
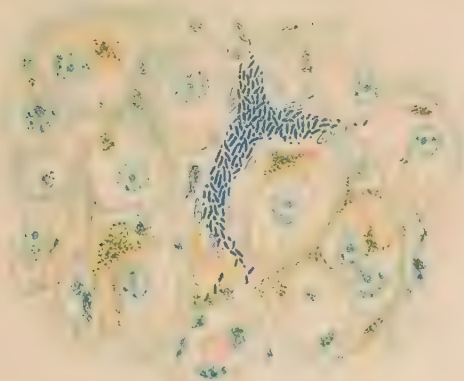


BACILLUS COLI COMMUNIS

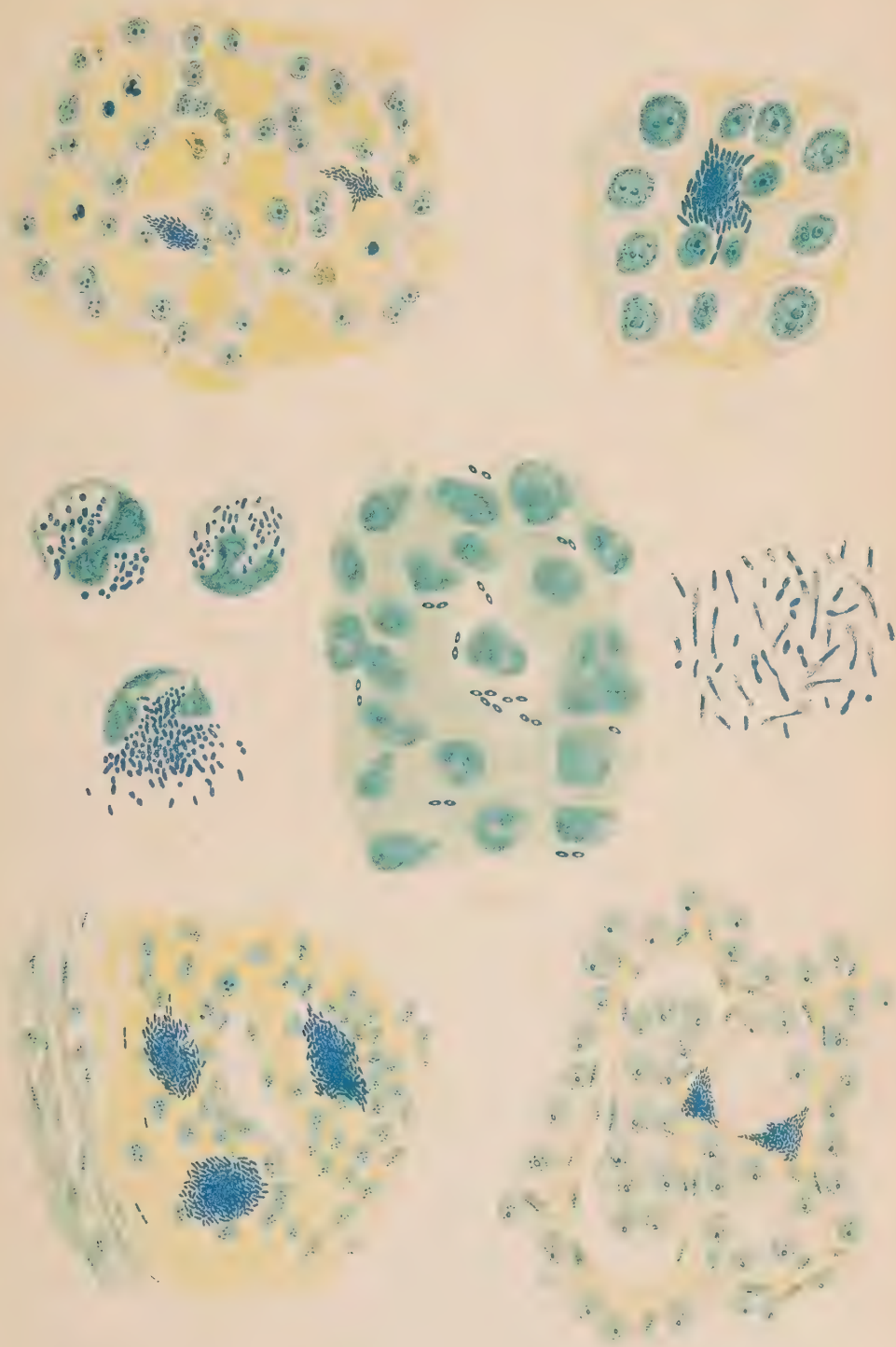














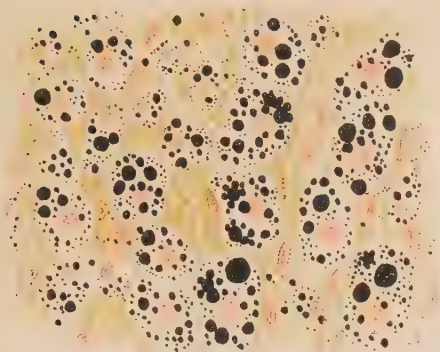


FIG. 1



FIG. 2



FIG. 3

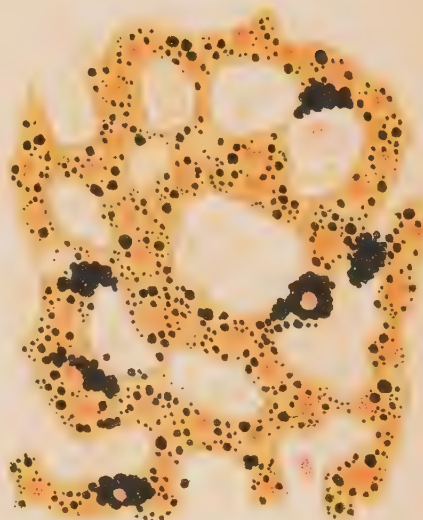


FIG. 4

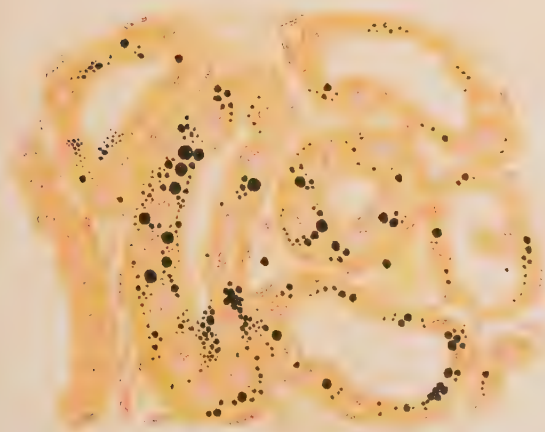


FIG. 5

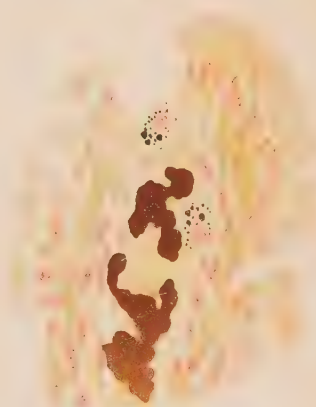
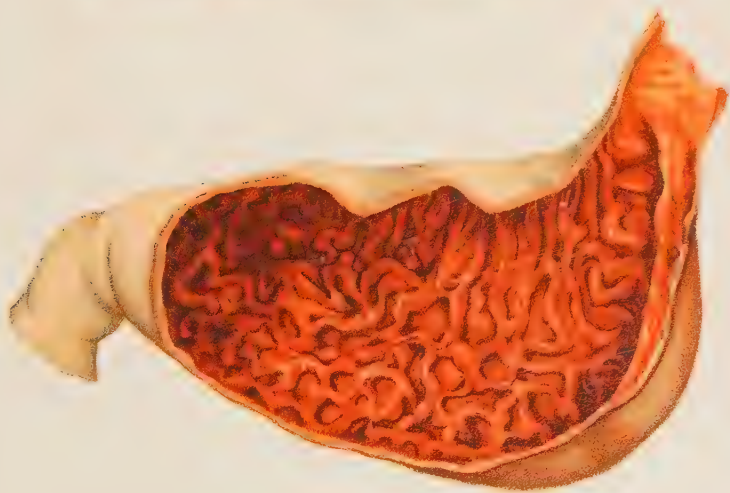
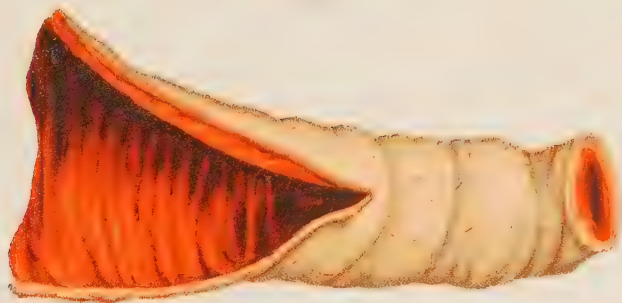


FIG. 6











P.L. Simonet del.

V. Rousse! lith.

*Coccidium Salamandrae*







P. L. Simond del.

V. Roussel lith.

Coccidium oviforme.  
Coccidium proprium.

Imp. A. LaFontaine & Fils, Paris



17

6

7

11

14

10

5

8

9

13

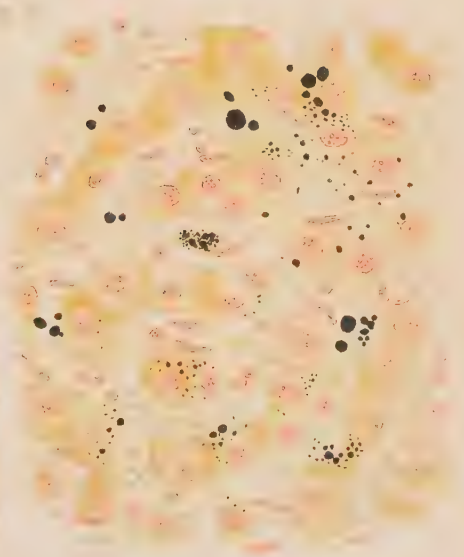
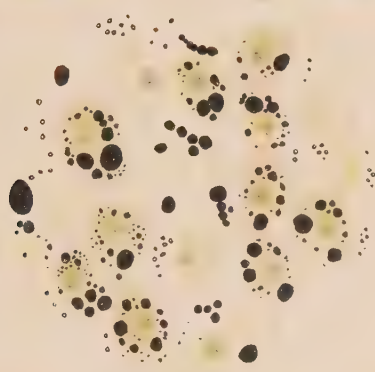
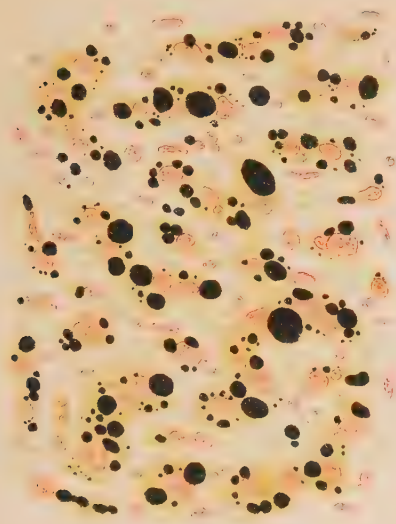
3

22

23

24









FIEVRE JAUNE EXPERIMENTALE

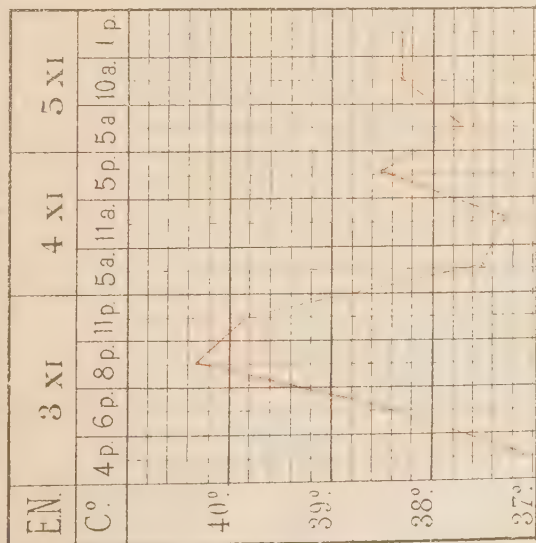


Fig. 1 Courbe thermique de E. N. (Obs. III)

FRANKLIN

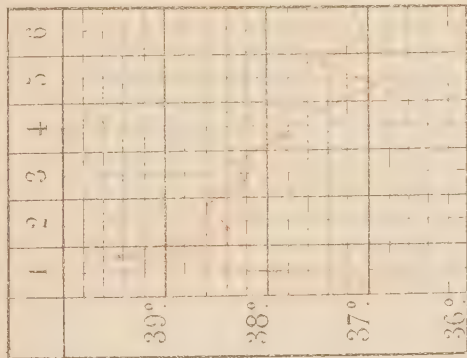


Fig. 2 *Courbe thermique schématique d'un cas mortel de fièvre jaune*  
(D'après les Drs. F. Fajardo et Ch. Seidl de Rio de Janeiro)

EXPERIMENTALE

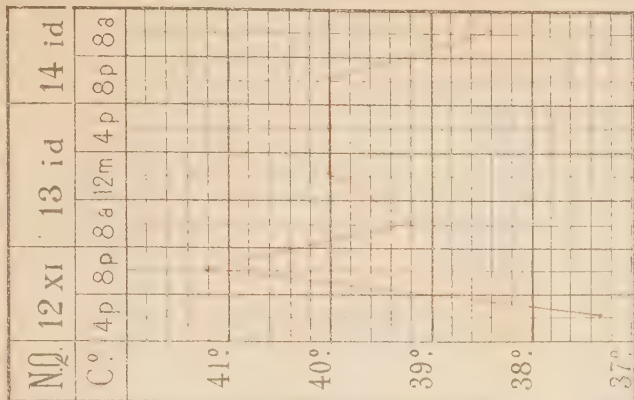


Fig. 3. Courbe thermique de N. Q.  
(Obs. IV)

FIEVRE JAUNE NATURELLE

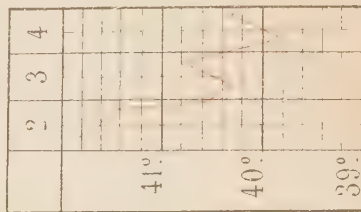


Fig. 4 Courbe  
thermique d'un  
cas mortel de fie-  
vre jaune à mor-  
che très rapide.  
(D'après le Dr.  
Naegeli de Rio de  
Janeiro).

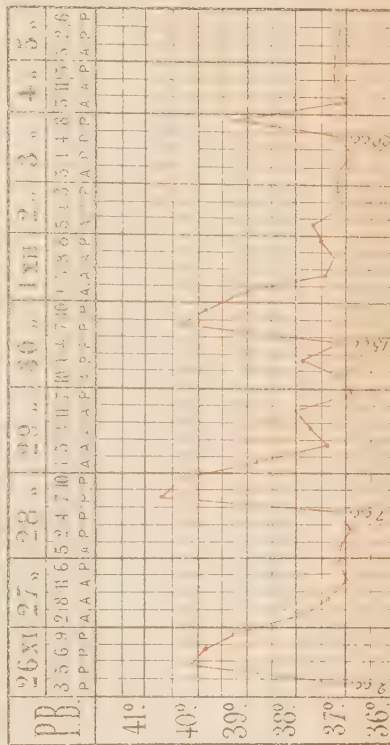


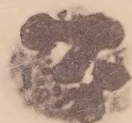
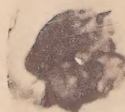
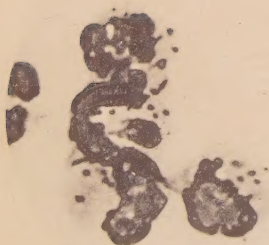
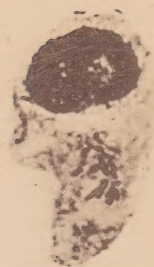
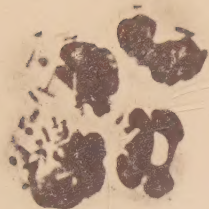
Fig. 5 Courbe thermique de P. B.  
(Obs. V')











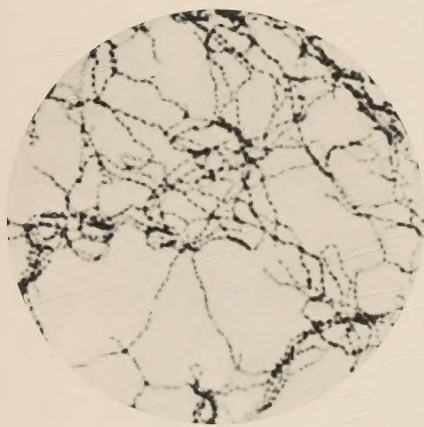




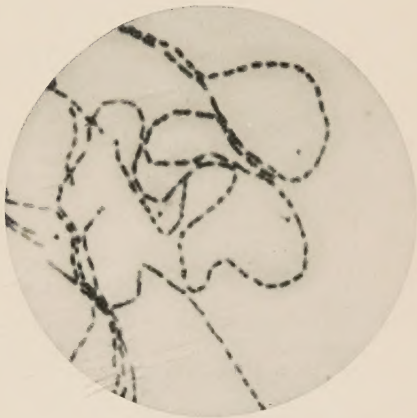
1



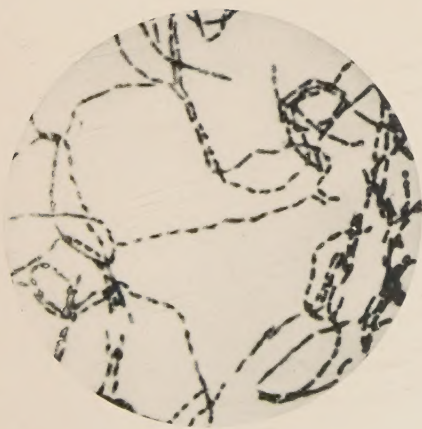
2



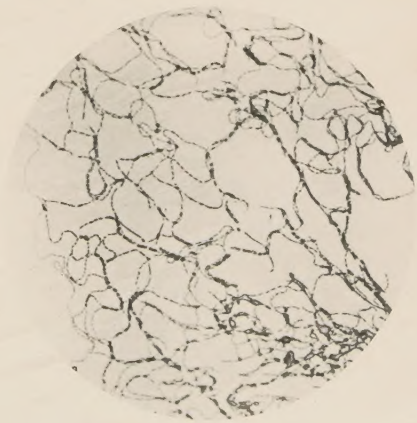
3



4



5



6

